

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de levaduras causantes de fungemia:
identificación y sensibilidad antifúngica, epidemiología
molecular y factores de patogenicidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Laura Judith Marcos Zambrano

DIRECTOR

Jesús Vicente Guinea Ortega

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



FACULTAD DE FARMACIA

**CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS CAUSANTES DE
FUNGEMIA: IDENTIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA,
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y FACTORES DE
PATOGENICIDAD**

TESIS DOCTORAL

LAURA JUDITH MARCOS ZAMBRANO

DIRECTOR DE TESIS:

DOCTOR JESÚS VICENTE GUINEA ORTEGA

A mi sol y mis estrellas

AGRADECIMIENTOS

Tras tantos años de dedicación y esfuerzo, me llena de satisfacción poder ver acabado este proyecto y me siento feliz y plena por todos los conocimientos que he adquirido durante este proceso.

La realización de esta tesis doctoral se ha podido llevar a cabo gracias al esfuerzo y colaboración de muchas personas que me han brindado su apoyo a nivel laboral y/o personal por lo que quiero agradecerles de corazón.

En primer lugar al Dr. Emilio Bouza por permitirme formar parte del Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas-VIH del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y hacer posible que este trabajo haya sido llevado a cabo, del mismo modo a la Dra. Patricia Muñoz y a todos mis compañeros del Servicio de Microbiología por sus aportaciones y colaboraciones en los trabajos aquí presentados.

A Jesús, mi director de tesis por darme la oportunidad de emprender este camino y enseñarme el mundo del hongo, por sacar lo mejor de mí en todo momento y por orientarme.

A Pilar, por brindarme su apoyo y compañía durante todos estos años, ayudarme cuando era necesario y compartir sus conocimientos conmigo. Por ser mi post-doc, mi compañera, mi hermana mayor, y mi amiga.

A mis compis de laboratorio Ana y María, por darme ánimos cuando era necesario y echarme una mano siempre, tanto a nivel personal como laboral.

A mis vecinos de laboratorio David, Natalia, Luis y Fabio por hacer más amenos los desayunos y las comidas y enseñarme la “cultura” española.

A Iván por estar siempre atento y dispuesto a echar una mano cuando ha sido necesario.

A Agustina, por estar siempre pendiente de mí y por esas charlas tan amenas que nos alegran el laboratorio.

A Laura y Yurena, por servirme de ejemplo y darme un buen consejo cuando ha sido necesario.

A mis amigos, que han estado a mi lado apoyándome y dándome ánimos para sacar adelante este trabajo y que han tenido paciencia cada vez que no he podido quedar con ellos porque estaba: “con la tesis”.

A Pedro, por los gestos de cariño y ánimo durante el arduo trabajo de escritura.

A mi familia, que a pesar de la distancia siempre me hacen llegar su cariño y sobretodo a mi Padre por su apoyo incondicional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
1. Epidemiología de la fungemia.....	13
2. Diagnóstico y manejo de la candidemia.....	15
2.1. Diagnóstico basado en el cultivo	15
2.1.1. Métodos fenotípicos.....	16
2.1.2. Métodos proteómicos.....	16
2.1.3. Métodos moleculares.....	17
2.2. Diagnóstico por métodos independientes del cultivo	18
2.2.1. Sondas de ácido peptidonucleico combinadas con hibridación <i>in situ</i> fluorescente (PNA-FISH).....	19
2.2.2. Biomarcadores y métodos moleculares.....	19
2.3. Manejo de la candidemia.....	20
2.4. Tratamiento antifúngico	21
3. Estudio de la sensibilidad antifúngica	22
3.1. Métodos para el estudio de la sensibilidad antifúngica	22
3.1.1. Difusión en disco.....	22
3.1.2. Microdilución en caldo.....	22
3.1.3. Métodos comerciales	23
3.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y puntos de corte clínicos y epidemiológicos	23
4. Bases moleculares de la resistencia antifúngica.....	26
4.1. Resistencia a azoles y efecto arrastre	26
4.2. Resistencia a equinocandinas y efecto paradójico.....	27
5. Estado actual de la resistencia antifúngica	28
6. Caracterización genotípica de las cepas causantes de candidemia.....	30
6.1. Brotes de candidemia.....	30
6.2. Vías de transmisión	31
6.3. Técnicas de tipado molecular	32

6.4. Secuenciación del genoma completo como técnica de tipado molecular.....	32
7. Patogenicidad de <i>Candida</i>	33
7.1. Virulencia.....	33
7.2. Formación de biopelículas.....	35
OBJETIVOS	39
JUSTIFICACIÓN.....	43
MATERIAL Y MÉTODOS	49
1. Descripción del Hospital	51
2. Definiciones clínicas	51
2.1. Episodio de fungemia	51
2.2. Infección polifúngica	51
2.3. Otras definiciones clínicas	51
3. Aislados clínicos estudiados	52
3.1. Cepas provenientes de hemocultivos de pacientes ingresados en el Hospital Gregorio Marañón	52
3.2. Cepas de otros orígenes, con características especiales, o provenientes de otros centros	52
3.2.1. Cepas ATCC.....	52
3.2.2. Cepas con mutaciones en los genes <i>fk</i> s	52
3.2.3. Cepas originadas en el catéter.....	53
3.2.4. Cepas procedentes de pacientes ingresados en otros centros	54
3.2.5. Cepas de <i>C. guilliermondii</i>	54
4. Pruebas de sensibilidad antifúngica.....	55
4.1. EUCAST EDef 7.2	55
4.2. E-test de micafungina	56
4.2.1. Comparación entre procedimientos.....	56
4.3. Interpretación de la sensibilidad a antifúngicos.....	56
4.4. Cálculo del efecto arrastre o “trailing”	57
4.5. Determinación del efecto paradójico.....	58

5. Estudios moleculares para la realización de caracterizaciones microbiológicas complejas	59
5.1. Identificación molecular de levaduras	59
5.2. Caracterización de mutaciones en los genes <i>FKS</i>	59
5.3. Genotipado mediante microsatélites	59
5.3.1. Genotipado de <i>C. albicans</i>	59
5.3.2. Genotipado de <i>C. parapsilosis</i>	60
5.3.3. Genotipado de <i>C. glabrata</i>	60
5.3.4. Genotipado de <i>C. tropicalis</i>	60
5.4. Análisis genético de diversidad.....	61
6. Formación de biopelículas	61
6.1. Estudio de la biomasa de la biopelículas mediante tinción de cristal violeta.....	62
6.2. Estudio de la actividad metabólica de las biopelículas mediante el ensayo de reducción de XTT	62
6.3. Sensibilidad antifúngica de las biopelículas	63
6.4. Estudio de la estructura de las biopelículas mediante microscopía electrónica de barrido.....	63
7. Estudio de “fitness”	64
7.1. Curvas de crecimiento	64
7.2. Modelo de infección sobre larvas de <i>Galleria mellonella</i>	64
7.2.1. Evaluación histológica de las larvas de <i>G. mellonella</i>	66
RESULTADOS	67
1. Identificación y sensibilidad a antifúngicos de levaduras causantes de fungemia	69
1.1. Epidemiología de las especies causantes de fungemia	69
1.2. Susceptibilidad antifúngica	71
1.3. Comparación entre el procedimiento EUCAST Edef 7.2 y el E-Test para la determinación de la sensibilidad de <i>Candida</i> spp. a micafungina.....	76
1.4. Alcance y frecuencia del efecto arrastre o “trailing” a fluconazol evaluado mediante EUCAST en aislados de <i>Candida</i> spp.....	78

1.5.	Frecuencia del efecto paradójico observado usando el procedimiento de EUCAST con micafungina, anidulafungina y caspofungina frente a cepas de <i>Candida</i> spp. causantes de fungemia	82
2.	Caracterización genotípica y estudio de la diversidad clonal de las principales especies de <i>Candida</i> causantes de candidemia	83
2.1.	¿La identificación a nivel de especie proporciona evidencia suficiente para confirmar la fungemia relacionada con el catéter causada por <i>C. albicans</i> ? .	83
2.2.	¿Es la candidemia relacionada con el catéter una infección policlonal?.....	86
2.3.	Genotipos de <i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> causantes de “clusters” de pacientes con candidemia: diferencias de frecuencia entre hospitales.....	90
3.	Estudio de la formación de biopelículas por parte de aislados de <i>Candida</i> spp. causantes de fungemia y determinación de su sensibilidad a antifúngicos	95
3.1.	Producción de biopelículas por aislados de <i>Candida</i> y otros géneros causantes de fungemia: comparación de la producción de biomasa y actividad metabólica y desarrollo de puntos de corte	95
3.2.	Micafungina es más activa frente a biopelículas de <i>C. albicans</i> con elevada actividad metabólica	101
3.3.	La sensibilidad de las biopelículas de <i>C. albicans</i> a caspofungina y anidulafungina no se ve afectada por su actividad metabólica o biomasa.....	102
3.4.	Producción de biopelículas y actividad anti-biopelícula de las equinocandinas y anfotericina B liposomal en especies de levaduras resistentes a equinocandinas.....	106
3.5.	Comparación de la actividad antifúngica de micafungina y anfotericina B frente a biopelículas de <i>C. tropicalis</i>	113
4.	Estudio de la patogenicidad de <i>Candida</i> spp. en base a la letalidad sobre el modelo de <i>G. mellonella</i>	115
4.1.	Aislamientos de <i>C. albicans</i> causantes de candidemia muestran diferentes grados de patogenicidad en el modelo de <i>Galleria mellonella</i>	115
4.2.	<i>C. guilliermondii</i> complex se caracteriza por una alta resistencia a los antifúngicos pero baja mortalidad atribuible: análisis de 22 casos de candidemia.....	119
	DISCUSIÓN.....	125

1. Identificación y sensibilidad antifúngica de levaduras causantes de fungemia... 128	128
2. Caracterización genotípica y estudio de la diversidad clonal de las principales especies de <i>Candida</i> causantes de candidemia 136	136
3. Estudio de la formación de biopelículas por parte de aislados de <i>Candida</i> spp. causantes de fungemia y determinación de su sensibilidad a antifúngicos 140	140
4. Estudio de la patogenicidad de <i>Candida</i> spp. en base a la letalidad sobre el modelo de <i>G. mellonella</i> 145	145
CONCLUSIONES 149	149
RESUMEN/SUMMARY 153	153
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 163	163
ANEXOS..... 189	189

A scanning electron micrograph (SEM) of a filamentous bacterium, likely from the genus Beggiatoa. The bacterium consists of a long, thin, cylindrical cell body with a textured surface. Several spherical spores are attached to the cell body, some at the ends of short filaments extending from the main cell. The background is dark, and the bacterium is illuminated from the side, creating a sense of depth and highlighting its three-dimensional structure.

Introducción

1. Epidemiología de la fungemia

La infección fúngica invasiva (IFI) es una infección oportunista con elevada morbi-mortalidad que afecta mayoritariamente a pacientes inmunodeprimidos y/o ingresados en unidades de cuidados intensivos (Leroy et al., 2009). La incidencia de las IFIs se ha incrementado debido al aumento en el número de pacientes en riesgo. La fungemia es la IFI más frecuente y las levaduras del género *Candida* son sus principales agentes etiológicos (Pfaller y Diekema, 2007). Se trata de comensales humanos ubicuos, potencialmente causantes de IFI (candidiasis invasiva) en cualquier localización del organismo (Cervera, 2012). La candidiasis invasiva engloba dos entidades distintas, la candidemia (limitada al torrente circulatorio) y la candidiasis invasora profunda en la que se encuentran afectadas diferentes vísceras (Cervera, 2012).

La candidemia constituye la tercera causa de infección del torrente circulatorio en el paciente hospitalizado, siendo la IFI más frecuente en el paciente crítico sin neutropenia; se trata de una entidad cuya incidencia se ha incrementado notablemente durante los últimos 20 años (Pfaller y Diekema, 2007, Leroy et al., 2009). La incidencia de candidemia en España ha sido recientemente publicada y supone un total de 8,1 casos por cada 100.000 habitantes, presenta una mortalidad atribuible del 15-35% en adultos y del 10-15% en neonatos, y los costes por hospitalización por paciente infectado ascienden a 40.000 dólares americanos (Puig-Asensio et al., 2013, Fridkin, 2005). Las tasas de mortalidad temprana y tardía (7 días y 30 días) son de 13% y 30%; respectivamente; mientras que la mortalidad temprana se asocia con factores relacionados con el manejo del paciente (terapia antifúngica apropiada y retirada temprana del catéter venoso central), la mortalidad tardía se asocia más con las condiciones de base del paciente (Puig-Asensio et al., 2014).

Entre los principales factores predisponentes para el desarrollo de candidemia destacan las alteraciones en las barreras mucosas o cutáneas, defectos en la inmunidad celular, edades extremas, y el uso de dispositivos extravasculares (Pfaller y Diekema, 2007). El uso de antibióticos de amplio espectro, quimioterapia y los trasplantes aumentan también el riesgo de candidemia. Los pacientes con candidemia frecuentemente presentan diferentes factores predisponentes simultáneamente, y aquellos más destacables se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Factores de riesgo más relevantes para el desarrollo de candidemia (Pfaller y Diekema, 2007, McCarty y Pappas, 2016).

Factor de riesgo	Posible papel en la infección
Uso de antimicrobianos	Promueven la colonización fúngica
Uso de corticoides	Inmunosupresión
Edades extremas <1 y >70 años	Inmunosupresión
Quimioterapia	Inmunosupresión Alteración de la mucosa digestiva
Enfermedad maligna	Inmunosupresión
Colonización previa	Traslocación a través de la mucosa
Catéter permanente	Acceso vascular directo
Catéter venoso central	Acceso vascular directo
Nutrición parenteral total	Acceso vascular directo Hiperglucemia
Neutropenia <500 ^{mm3}	Inmunosupresión
Cirugía (especialmente gastrointestinal)	Ruta de la infección Acceso vascular directo
Fallo renal o hemodiálisis	Ruta de la infección Inmunosupresión
Malnutrición	Inmunosupresión
Estancia en la unidad de cuidados intensivos	Factores de riesgo propios del paciente crítico
Severidad de la enfermedad de base	Inmunosupresión Procedimientos invasivos

La distribución de especies causantes de candidemia varía según el área geográfica estudiada. El programa ARTEMIS “DISK Global Antifungal Surveillance Study”, que involucraba a 127 centros distribuidos por todo el mundo, demostró que solo 5 especies (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*) son responsables hasta del 92% de los casos de candidemia (Pfaller et al., 2005). En prácticamente todas las series de candidemia, *C. albicans* es la principal especie causante suponiendo entre el 45% y el 70% de los casos, dependiendo de la zona geográfica (Pfaller et al., 2005, Puig-Asensio et al., 2014). La proporción de casos causados por *C. parapsilosis* y *C. glabrata* varía considerablemente entre series: mientras que en el norte de Europa y Estados Unidos *C. glabrata* es la segunda especie más frecuente (hasta el 29%), en países del sur de Europa y Latinoamérica esta proporción es menor y *C. parapsilosis* es la segunda especie más frecuentemente aislada (Guinea, 2014).

En un estudio poblacional recientemente realizado en España durante los años 2010-2011, *C. albicans* fue la especie más frecuente. La distribución de especies en este estudio se muestra en la Figura 1. Hasta un 5% (n=42) de los casos fueron causados por especies menos comunes de *Candida* (*C. dubliniensis*, *C. lypholitica*, *C. kefyr*, *Pichia anomala*, *Kodamaea ohmeri*, y otras) y levaduras de otros géneros (*Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon asahii*) caracterizados por presentar una sensibilidad antifúngica disminuida (Guinea et al., 2014).

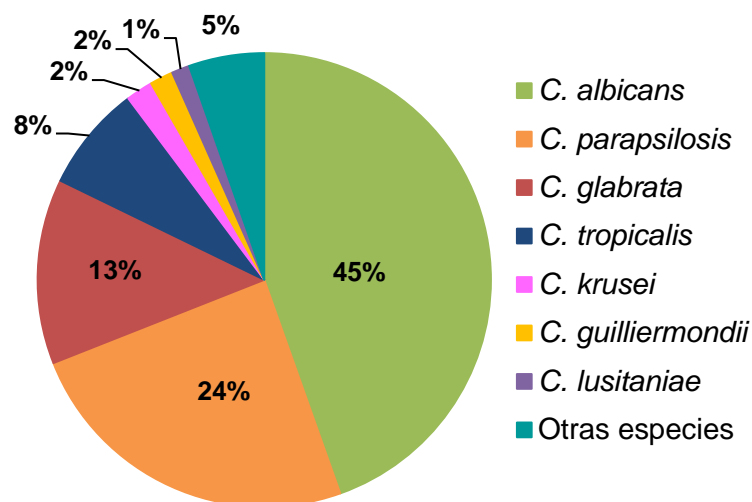


Figura 1: Distribución de especies causantes de fungemia en España, según el estudio poblacional CANDIPOP llevado a cabo durante los años 2010-2011 (Guinea et al., 2014).

2. Diagnóstico y manejo de la candidemia

2.1. Diagnóstico basado en el cultivo

El diagnóstico de la candidemia se basa fundamentalmente en el aislamiento de *Candida* spp. en botellas de hemocultivos, aunque este procedimiento adolece de una baja sensibilidad y se estima que el 50% de los casos de candidiasis invasora no cursan con hemocultivos positivos (McCarty y Pappas, 2016). A pesar de ello, es un procedimiento ampliamente utilizado en la práctica clínica porque permite realizar la identificación de la especie causante y estudiar su sensibilidad antifúngica. El catéter es uno de los principales focos y la candidemia relacionada con el catéter se define como el aislado de la misma especie de *Candida* tanto en el cultivo de la punta de

catéter (≥ 15 UFC) como en el hemocultivo extraído de sangre periférica (Ferrer y Almirante, 2014).

La identificación de las levaduras descansa en técnicas fenotípicas, proteómicas o moleculares.

2.1.1. Métodos fenotípicos

Estos métodos se basan en la visualización de elementos morfológicos o características bioquímicas de los aislados. Los medios cromogénicos están diseñados para el aislamiento e identificación de algunas especies del género *Candida* tras su incubación a 30-37 °C durante 24-48 horas. Su fundamento es la detección de determinadas actividades enzimáticas de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Los más empleados son CHROMagar *Candida*®, COLOREX *Candida*®, Chromogen *albicans*®, *Candida* ID®, y CandiSelect™.

La identificación basada en métodos de asimilación de nutrientes se fundamenta en el estudio individualizado de una batería de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitrogenados, sobre un medio sintético base para determinar el crecimiento selectivo de un aislado en su presencia. Existen diversas opciones comerciales para realizar estas pruebas como AuxaColor™, Uni-Yeast-Tek®, y API 20C AUX®. Existen sistemas automatizados para la detección del metabolismo de levaduras: Sistema Vitek® 2, Sistema Biolog YT MicroPlate®, Rapid Yeast Identification Panel MicroScan® (Alam et al., 2014).

2.1.2. Métodos proteómicos

La espectrometría de masas, conocida como “matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry” (MALDI-TOF MS), es una técnica que permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosómicas, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada especie (Bader et al., 2011). Un microorganismo dado presentará siempre una serie de picos característicos en el espectro, y esto permite la creación de bases de datos con los espectros de masas. El espectro obtenido para un determinado microorganismo se compara automáticamente con la base de datos, y el resultado se emite junto a una puntuación (Bader et al., 2011).

Esta técnica permite la rápida identificación a nivel de especie de aislados de especies que se encuentren bien representadas en la base de datos. En la Tabla 2 se

resumen las especies de *Candida* spp. que pueden identificarse correctamente con MALDI-TOF MS, alcanzado al 98% de los aislados estudiados e incrementando la capacidad de identificación convencional (Lacroix et al., 2014):

Tabla 2: Porcentaje de cepas correctamente identificadas mediante identificación convencional con el sistema API® ID32C y MALDI-TOF MS de cada una de las especies estudiadas (Sendid et al., 2013, Lacroix et al., 2014).

Especie	ID convencional	MALDI-TOF
<i>C. albicans</i>	100%	100%
<i>C. dubliniensis</i>	0%	100%
<i>C. glabrata</i>	100%	100%
<i>C. bracariensis</i>	0%	100%
<i>C. tropicalis</i>	100%	100%
<i>C. parapsilosis</i>	98%	99%
<i>C. orthopsilosis</i>	0%	100%
<i>C. metapsilosis</i>	0%	100%
<i>C. krusei</i>	100%	100%
<i>C. kefyr</i>	100%	100%
<i>C. lusitaniae</i>	100%	100%
<i>C. inconspicua</i>	100%	99%
<i>C. guilliermondii</i>	100%	100%
<i>C. norvegensis</i>	100%	0%
<i>C. famata</i>	25%	0%
<i>C. fermentati</i>	0%	0%
<i>C. lypolytica</i>	100%	100%
<i>Trichosporon mucoides</i>	100%	100%
<i>Trichosporon inkin</i>	0%	100%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93%	68%

2.1.3. Métodos moleculares

En los últimos años, tras la introducción de la biología molecular, se han producido cambios relevantes en la taxonomía de los hongos, apareciendo o bien nuevas especies de interés clínico o bien especies crípticas dentro de complejos ya conocidos. La identificación molecular proporciona una identificación rápida y precisa de cada uno de los aislados clínicos.

El ADN que codifica para el ARN ribosomal de los hongos se encuentra repetido en diversas unidades a lo largo del genoma. Cada una de estas unidades está constituida por tres genes, cada uno de los cuales codifica para la región 18S, 5,8S y 26S. Estos genes, a su vez, están separados por unidades no codificantes denominadas ITS (internal transcribed spacer), existiendo dos regiones no codificantes

(ITS1 [entre el gen 18S y 5,8S] y la región ITS2 [entre el gen 5,8S y el 26S]). Estas regiones, especialmente las regiones intergénicas, son lo suficientemente variables como para permitir distinguir inequívocamente las distintas especies del género *Candida*.

El documento MM-18A del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) titulado “Criterios interpretativos para la identificación de bacterias y hongos por secuenciación de ADN diana”, indica que la amplificación y secuenciación de la región ITS es la diana para la identificación a nivel de género y especie de la mayoría de las levaduras de importancia clínica. El fragmento amplificado normalmente tiene un tamaño que varía entre 400 y 800 pares de bases, y al tener múltiples copias su detección presenta una elevada sensibilidad (Alam et al., 2014).

Los “primers” generalmente usados para la amplificación son los “ITS 1” e “ITS 4” que amplifican la región completa ITS1-5,8S-ITS2 (Figura 2). Esta región sirve para identificar a nivel de género y especie Ascomicetos y Basidiomicetos como, *Saccharomyces* spp., *Geotrichum*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* spp., *Rhodotorula*, y *Candida* spp. (en este último caso. puede ser suficiente amplificar solo la región ITS2).

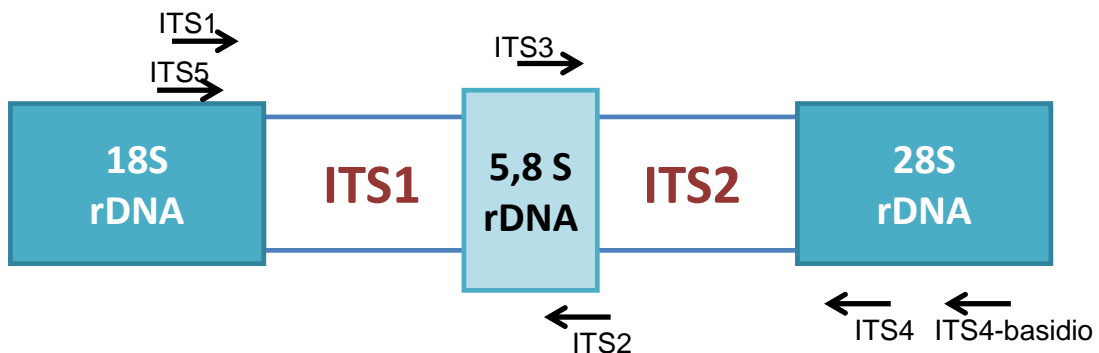


Figura 2: Esquema de la región ITS y los “primers” usados para su amplificación.

2.2. Diagnóstico por métodos independientes del cultivo

Para poder diagnosticar a los pacientes con candidiasis invasora que no tienen candidemia o incluso anticipar el diagnóstico de aquellos pacientes candidémicos se cuenta con métodos independientes del cultivo (Clancy and Nguyen, 2013). A continuación se resumen los métodos más relevantes.

2.2.1. Sondas de ácido peptidonucleico combinadas con hibridación *in situ* fluorescente (PNA-FISH)

La técnica PNA FISH (Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridation; AdvanDx, Inc, Woburn, Estados Unidos) permite la identificación de microorganismos visualizados en tinciones microscópicas en unas 2 horas y media (McCarty y Pappas, 2016). Se pueden detectar las especies más importantes del género *Candida* incluyendo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, y *C. krusei*, dependiendo del color emitido en la fluorescencia (Harris y Hata, 2013). Aunque este procedimiento no mejora la baja sensibilidad del hemocultivo, anticipa la identificación, lo que ha demostrado disminuir el uso de antifúngicos de amplio espectro (Harris y Hata, 2013).

2.2.2. Biomarcadores y métodos moleculares

Las herramientas diagnósticas basadas en la detección de biomarcadores circulantes en suero han ido cobrando importancia en el laboratorio de microbiología clínica, entre estas destacan la detección de antígeno manano y/o anticuerpos antimanano, la detección de anticuerpos antimicelio (*C. albicans* germ tube antibodies CAGTA), la detección del 1,3-β-D-glucano, y la detección de ADN de *Candida*.

La detección de manano, el antígeno mayoritario e inmunodominante de la pared celular de *Candida*, y de anticuerpos (antimanano) frente a este antígeno ha de realizarse de forma conjunta en pacientes con sospecha de candidiasis invasora, lo que ha demostrado ser útil sobre todo en pacientes neutropénicos debido a su elevado valor predictivo negativo (95%) y la anticipación en el diagnóstico (Ponton, 2009). Dada la alta prevalencia de anticuerpos antimanano en la población sana y/o colonizada, se han estudiado otros anticuerpos más específicos de candidiasis invasora como los CAGTA. La detección de CAGTA presenta una elevada sensibilidad (84,4%) y especificidad (94,7%). Además, también permite monitorizar la evolución del paciente (Ponton, 2009), y potencialmente estudiar el origen de la candidiasis (Martinez-Jimenez et al., 2014). El 1,3-β-D-glucano (componente de la pared celular fúngica que se libera durante la infección) es un biomarcador panfúngico cuya detección presenta un alto valor predictivo negativo que permite excluir la presencia de candidemia (Martinez-Jimenez et al., 2015).

La detección de ADN microbiano en sangre por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está todavía en debate para el diagnóstico de la candidemia. Comparado con el cultivo, la PCR ha demostrado disminuir los tiempos de

diagnóstico y anticipar el inicio de la terapia antifúngica. La sensibilidad y especificidad de la PCR según un reciente meta-análisis es del 95% y 92% respectivamente (Avni et al., 2011). El sistema “T2 *Candida* assay” se basa en una PCR comercializada que utiliza detección mediante resonancia magnética para detectar la presencia de *Candida* en muestras de sangre completa de manera automatizada y rápida (entre 3 y 4 horas) con una sensibilidad analítica de hasta 1 UFC/ml y esperanzadores valores predictivos positivos y negativos (91,7% y 99,6%, respectivamente) (McCarty y Pappas, 2016).

2.3. Manejo de la candidemia

La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) ha publicado recientemente una actualización de las guías clínicas para el manejo de la candidiasis, recomendando establecer el tratamiento antifúngico en base al tipo de paciente y el manejo del foco de infección. En pacientes con candidemia relacionada con el catéter se ha demostrado que la retirada del catéter se correlaciona con un aclaramiento más rápido de la candidemia y un mejor pronóstico (Rex et al., 1995, Anaissie et al., 1998). Sin embargo, este es aún un tema controvertido. Un estudio reciente señala que aquellos pacientes en tratamiento con equinocandinas o anfotericina B liposomal no se beneficiaron de la retirada temprana del catéter (Nucci et al., 2010). En este sentido, las guías actualizadas de la IDSA recomiendan la retirada temprana del catéter en pacientes no neutropénicos si se presume que el mismo es el foco de la infección y si se puede retirar con seguridad, aunque esta decisión debe ser individualizada para cada paciente. Para los pacientes neutropénicos, se considera que predominan otros focos distintos al catéter (principalmente abdominal); sin embargo, en caso de que se confirmase que el catéter es el origen, debe valorarse su retirada de manera individualizada (Pappas et al., 2016).

La técnica de sellado de catéter pretende esterilizar el catéter colonizado y así controlar el foco y evitar su retirada. Para ello se utiliza una instilación prolongada de una solución de antimicrobiano o alguna sustancia antiséptica a concentraciones altas (hasta 1.000 veces por encima de la CMI), sobre un catéter intravascular infectado, usualmente en conjunción con administración de antimicrobianos sistémicos (Walraven y Lee, 2013). Actualmente esta técnica se recomienda por las guías de la IDSA para el manejo de la bacteriemia relacionada con el catéter, sin embargo, en el caso de infección de catéter por *Candida* este procedimiento se usa solamente en circunstancias muy particulares (Mermel et al., 2009).

2.4. Tratamiento antifúngico

Los antifúngicos empleados para el tratamiento de la candidemia incluyen la anfotericina B (deoxicolato y las formas lipídicas), equinocandinas (anidulafungina, caspofungina y micafungina) y azoles (fluconazol y voriconazol) (McCarty y Pappas, 2016).

La anfotericina B es un agente fungicida, cuya diana es el ergosterol de la membrana fúngica al que se une creando poros que permiten que los iones difundan a través de la membrana (Odds et al., 2003). Debido a su hidrofobicidad y pobre absorción gastrointestinal, se administra de forma intravenosa (Odds et al., 2003). Su nefrotoxicidad se ha minimizado en los últimos años con las formulaciones lipídicas que presentan mejor solubilidad (Dupont, 2002).

Las equinocandinas son agentes fungicidas que interrumpen la biogénesis de la pared celular de los hongos, mediante la inhibición no competitiva de la enzima β -1,3-D-glucano-sintetasa, específicamente la subunidad Fks1, resultando en inestabilidad osmótica y muerte de las células fúngicas (Denning, 2003). La estructura básica de las equinocandinas consiste en un hexapéptido cíclico con diferentes cadenas en la posición R5 que le otorgan la actividad antifúngica (Valgus, 2003). En esa posición, caspofungina presenta un ácido graso, micafungina un complejo aromático, y anidulafungina un grupo alcoxicitrifenilo. Estos fármacos son poco absorbidos en el tracto gastrointestinal debido a sus altos pesos moleculares, pero son bien tolerados por los pacientes y presentan pocas interacciones medicamentosas, ya que su diana está ausente en las células de mamíferos (Petrikos y Skiada, 2007).

Los azoles son los antifúngicos más ampliamente usados en la clínica, sobre todo para el tratamiento preventivo de las IFIs. Estos fármacos actúan inhibiendo la enzima del citocromo P450 14α -lanosterol demetilasa (CYP51), codificada por el gen *ERG11*, que se encarga de convertir el lanosterol en ergosterol en la membrana celular inhibiendo así el crecimiento fúngico y la replicación (Odds et al., 2003, Sheehan et al., 1999). Los azoles son moléculas orgánicas cíclicas que pueden clasificarse en dos grupos: imidazoles (clotrimazol, miconazol y ketoconazol) y triazoles (itraconazol, fluconazol, posaconazol, voriconazol, e isavuconazol). Los imidazoles fueron los primeros azoles desarrollados, pero debido a su alta toxicidad, efectos secundarios y numerosas interacciones con otros fármacos fueron sustituidos por los triazoles (Morita y Nozawa, 1985). La primera generación de triazoles (itraconazol y fluconazol) presenta menos toxicidad que los imidazoles (Castelli et al.,

2014). El incremento en la resistencia a azoles se debe principalmente a que estos fármacos son fungistáticos y no fungicidas, por lo que se desarrolló una segunda generación de triazoles (voriconazol y posaconazol) con mayor espectro antifúngico (Campoy y Adrio, 2016, Peyton et al., 2015).

La 5-flucitosina (5-FC; 5-fluorocitosina) es un análogo de la pirimidina con actividad fungistática que interfiere en el metabolismo de la pirimidina, así como en la síntesis de proteínas del ARN/ADN; 5-FC es activa frente a *Candida* y *Cryptococcus* (Campoy y Adrio, 2016).

3. Estudio de la sensibilidad antifúngica

Las técnicas para el estudio de la sensibilidad antifúngica son empleadas para seleccionar los agentes antifúngicos que serán clínicamente efectivos frente a una cepa específica; su principal papel es la detección de cepas resistentes (Eschenauer and Carver, 2013). La estandarización de estos métodos para detectar cepas resistentes emergentes ha avanzado considerablement con la caracterización de las bases moleculares de la resistencia antifúngica (Eschenauer and Carver, 2013).

3.1. Métodos para el estudio de la sensibilidad antifúngica

3.1.1. Difusión en disco

Este método fue desarrollado por el CLSI (M44-A2 y M44-S2) y consiste en medir el halo de inhibición producido por un disco impregnado de antifúngico una vez sembrada la levadura en una placa de agar. Se trata de un método simple, desarrollado para *Candida* spp. y disponible para fármacos solubles en agua, tales como 5-flucitosina, fluconazol y voriconazol; sin embargo, la utilidad de este método está limitada por problemas de difusión en agar de los antifúngicos y por la falta de correlación con la clínica (Canton et al., 2009).

3.1.2. Microdilución en caldo

Estos son los procedimientos de referencia y consisten en la preparación de diluciones dobles seriadas del antifúngico en placas multipocillo inoculadas con suspensiones conocidas de levaduras cuyo crecimiento se mide y compara tanto en el medio con antifúngico como en aquel sin antifúngico. Con fecha de abril de 2017, los dos métodos de referencia para el estudio de la sensibilidad antifúngica son el M27-A3 del CLSI y el EDef 7.3.1 del EUCAST (Cuenca-Estrella and Rodriguez-Tudela, 2010).

Ambos métodos presentan pequeñas diferencias metodológicas como el tamaño del inóculo y la determinación de la CMI (Pfaller y Diekema, 2012). En la Tabla 5 se recogen las principales diferencias entre estos métodos.

Tabla 5: Diferencias entre los métodos de microdilución CLSI M27-A3 y EUCAST EDef 7.3.1 para el estudio de la sensibilidad antifúngica.

Parámetro	CLSI M27-A3	EUCAST E.DEF 7.3.1
Medio	RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y concentración de glucosa de 0,2%	RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y concentración de glucosa de 2%
Densidad del inóculo	0,5 – 2,5 x 10 ³ UFC/ml	1 – 5 x 10 ⁵ UFC/ml
Lectura	Visual	Espectrofotométrica a 530 nm
Forma de la placa multipocillo	Fondo en U	Fondo plano
Tiempo de incubación	24 h	24 h
Punto final de lectura de CMI para anfotericina B	Ópticamente transparente	Concentración más baja que inhibe el ≥90% del crecimiento en comparación con el control
Punto final de lectura de CMI para azoles y equinocandinas	Disminución del crecimiento ≥50% en comparación con el control de crecimiento	Concentración más baja que inhibe el ≥50% del crecimiento en comparación con el control

3.1.3. Métodos comerciales

Entre los métodos comerciales para el estudio de la sensibilidad antifúngica destacan el Sensititre YestOne® y el E-test®. El Sensititre YestOne® (TREK Diagnostic Systems, UK) es un panel multipocillo que lleva incorporados los antifúngicos deshidratados con un colorante de oxido-reducción (azul Alamar) que cambia de color azul (no crecimiento) a rosa cuando hay crecimiento (Canton et al., 2009). El E-test® es un método de difusión cuantitativo en placa de agar; el antifúngico va incorporado en uno de los lados de una tira de plástico no poroso a concentraciones crecientes impresas en la tira. La lectura de la CMI puede ser dificultosa para algunos azoles y especies de levaduras (Canton et al., 2009).

3.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y puntos de corte clínicos y epidemiológicos

La concentración mínima inhibitoria es la concentración mínima de antifúngico (CMI) que consigue una disminución del crecimiento del aislado mayor o igual al 50%

(azoles y equinocandinas) o al 100% (anfotericina B) en comparación con el control de crecimiento libre de antifúngico (Eschenauer y Carver, 2013).

El estudio de las CMI permite clasificar a los microorganismos como sensibles o resistentes de acuerdo a los puntos de corte clínicos, de manera que se puedan así diferenciar cepas con alta probabilidad de éxito terapéutico (cepas clínicamente sensibles) de aquellas con mayor probabilidad de fallo terapéutico (resistencia clínica) (Eschenauer y Carver, 2013). Una categoría clínica intermedia o sensible dosis dependiente (SDD) puede asignarse a aquellos patógenos que requieran dosis superiores para un correcto tratamiento (Kahlmeter et al., 2003).

En la Figura 3 se muestra una distribución normal de CMI con los puntos de corte clínicos y el punto de corte epidemiológico para fluconazol y *C. albicans*.

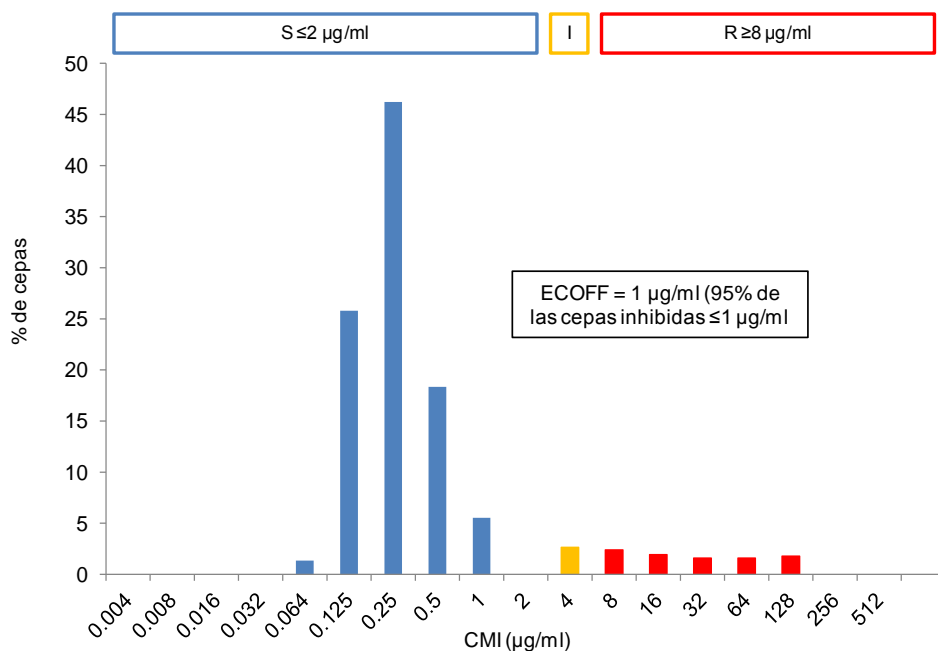


Figura 3: Ejemplo de distribución CMI de cepas de *C. albicans* frente a fluconazol. Puntos de corte clínicos $S \leq 2 \mu\text{g/ml}$, $I = 4 \mu\text{g/ml}$, $R \geq 8 \mu\text{g/ml}$. ECOFF = $1 \mu\text{g/ml}$ (95% de las cepas inhibidas $\leq 1 \mu\text{g/ml}$) correspondiente a la CMI que inhibe $\geq 95\%$ de las cepas estudiadas. Datos disponibles en la página web de “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”.

Los puntos de corte clínicos están diseñados para guiar la terapia antifúngica y pueden no ser suficientemente sensibles para detectar cepas portadoras de mecanismos de resistencia. Por este motivo es necesario conocer la distribución de CMIS de las cepas salvajes (“wild-type”) para una especie dada y establecer así los puntos de corte epidemiológicos (Eschenauer y Carver, 2013). Una cepa salvaje se

define como aquella que no posee mecanismos de resistencia adquiridos frente a un agente antimicrobiano dado (Arendrup et al., 2009).

Al determinar los rangos de valores de CMI de las cepas salvajes, aquellas no salvajes (con resistencia adquiridas) pueden ser identificados, ya que poseen CMI mayores que el límite superior de la distribución de cepas salvajes (punto de corte epidemiológico o ECOFF). El establecimiento del punto de corte epidemiológico es un valor de CMI que generalmente engloba al menos el 95% de las cepas, mientras que los puntos de corte clínicos también tienen en cuenta los índices farmacodinámico-farmacocinético, dosis, toxicidad, mecanismos de resistencia, indicaciones de uso, y evolución clínica de los pacientes (Eschenauer y Carver, 2013).

El CLSI y EUCAST han establecido puntos de corte específicos para las principales especies de *Candida* y la mayoría de los antifúngicos usados en clínica. Para el caso de las CMIs de caspofungina se han detectado problemas de variabilidad entre diferentes laboratorios, por lo que emplear los puntos de corte clínicos de este fármaco puede conducir a informar un número excesivo de aislados de *C. glabrata* y *C. krusei* como intermedios de manera artificial. Por este motivo, el EUCAST ha decidido no desarrollar puntos de corte para este fármaco (Espinel-Ingroff et al., 2013). Los puntos de corte actualizados con fecha de abril de 2017 se recogen en las Tablas 3 y 4:

Tabla 3: Puntos de corte clínicos o epidemiológicos para las principales especies de *Candida* según la metodología del CLSI. Las casillas sombreadas en gris indican puntos de corte epidemiológicos en aquellas especies en las que no hay puntos de corte clínicos.

Especie	Puntos de Corte Clínicos o Epidemiológicos ($\mu\text{g/ml}$)							
	Categoría	AmB	FLU	VOR	POS	AND	MYC	CAS
<i>C. albicans</i>	S \leq	-	2	0,12	-	0,25	0,25	0,25
	R >	2	4	0,5	0,06	1	1	1
<i>C. glabrata</i>	S \leq	-	-	-	-	0,12	0,06	0,12
	R >	2	32	1	2	0,5	0,25	0,5
<i>C. krusei</i>	S \leq	-	-	0,5	-	0,25	0,25	0,25
	R >	2	-	2	0,5	1	1	1
<i>C. parapsilosis</i>	S \leq	-	2	0,12	-	2	2	2
	R >	2	4	1	0,25	8	8	8
<i>C. tropicalis</i>	S \leq	-	2	0,12	-	0,25	0,25	0,25
	R >	2	4	0,5	0,12	1	1	1

AmB, Anfotericina B; FLU, Fluconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; AND, Anidulafungina; MYC, Micafungina; CAS, caspofungina.

Tabla 4: Puntos de corte clínicos o epidemiológicos para las principales especies de *Candida* según la metodología del EUCAST. Las casillas sombreadas en gris indican puntos de corte epidemiológicos en aquellas especies en las que no hay puntos de corte clínicos.

Especie	Puntos de Corte Clínicos o Epidemiológicos ($\mu\text{g/ml}$)						
	Categoría	AmB	FLU	VOR	POS	AND	MYC
<i>C. albicans</i>	S \leq	1	2	0,12	0,06	0,03	0,016
	R >	1	4	0,12	0,06	0,03	0,016
<i>C. glabrata</i>	S \leq	1	0,002	-	-	0,06	0,03
	R >	1	32	1	1	0,06	0,03
<i>C. krusei</i>	S \leq	1	-	-	-	0,06	-
	R >	1	-	1	0,5	0,06	0,25
<i>C. parapsilosis</i>	S \leq	1	2	0,12	0,06	0	0,002
	R >	1	4	0,12	0,06	4	2
<i>C. tropicalis</i>	S \leq	1	2	0,12	0,06	0,06	-
	R >	1	4	0,12	0,06	0,06	0,06

AmB, Anfotericina B; FLU, Fluconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; AND, Anidulafungina; MYC, Micafungina; CAS, caspofungina.

4. Bases moleculares de la resistencia antifúngica

La resistencia antifúngica puede definirse como resistencia microbiológica, clínica, o ambas. La resistencia microbiológica se define cuando el crecimiento del aislado es inhibido sólo a una concentración de antifúngico superior a la necesaria para inhibir a las cepas salvajes (Pfaller, 2012), concentraciones que generalmente no se alcanzan con esquemas de dosificación habitual (Pfaller, 2012). Los mecanismos de resistencia pueden ser primarios (intrínsecos de la especie) o secundarios (adquiridos por cepas concretas).

4.1. Resistencia a azoles y efecto arrastre

Existen varios mecanismos relacionados con la resistencia a azoles. El primero es la presencia de bombas de eflujo que conducen a una disminución de la concentración de fármaco en el lugar de la diana. Se basa en la sobre-expresión de las bombas de eflujo codificadas por los genes *MDR* o *CDR* y se ha asociado con resistencia en *C. albicans* (*MDR1*, *CDR1*, *CDR2*), *C. glabrata* (*CgCDR1*, *CgCDR2*) y *C. dubliniensis* (*CdMDR1*, *CdCDR1*) (Sanglard et al., 2009). Otro mecanismo de resistencia es la adquisición de mutaciones puntuales en el gen codificante de la enzima diana *ERG11*, resultando en alteraciones de la diana con afinidad reducida o

incapacidad de unirse a los azoles; este mecanismo puede combinarse si existe sobreexpresión o sobre regulación de la diana (Sanglard et al., 2009). El último mecanismo involucra mutaciones en el gen *ERG3* que codifica otras enzimas involucradas en la biosíntesis del ergosterol (Sanglard et al., 2009).

El “trailing” o “efecto arrastre” es un efecto *in vitro* observado con los azoles, principalmente con fluconazol, se define como la presencia de un crecimiento reducido pero persistente a concentraciones de antifúngico por encima de la CMI. Dicho crecimiento puede ser tan prominente que a veces conlleva a que una cepa sensible se clasifique erróneamente como resistente (Lee et al., 2004). Sin embargo, dos estudios independientes utilizando modelos murinos de candidiasis y aislados de *C. albicans* demostraron que la CMI (ignorando el efecto arrastre) fue consistente con la respuesta al tratamiento *in vivo* (Arthington-Skaggs et al., 2000, Rex et al., 1998). Por otro lado, la experiencia clínica demuestra que los aislados que presentan “trailing” son realmente sensibles.

4.2. Resistencia a equinocandinas y efecto paradójico

La resistencia a las equinocandinas se correlaciona con mutaciones puntuales en dos regiones “hot spot” (HS1 y HS2) de los genes *fks1* y *fks2*, encargados de codificar la subunidad catalítica de la 1,3-β-D-glucano sintetasa. Se han descrito mutaciones en estos genes para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Sanglard et al., 2009, Pfaller, 2012). Para *C. albicans*, los cambios de aminoácidos en Ser641 y Ser645 son los más frecuentes y causan el fenotipo más resistente (Perlin, 2011, Garcia-Effron et al., 2009b, Garcia-Effron et al., 2009a), mientras que en *C. glabrata*, las modificaciones de aminoácidos en Ser663 en *Fks2*, Ser629 en *Fks1*, y Phe659 en *Fks2* son las sustituciones más comunes (Garcia-Effron et al., 2009a).

Las cepas de *C. albicans* y *C. glabrata* con mutaciones en los genes *FKS* presentan una baja o nula respuesta a las equinocandinas en estudios farmacodinámicos con modelos de infección murina. El nivel de resistencia y el valor de la CMI dependen de la mutación presente ya que algunas confieren resistencia elevada, mientras que otras confieren menor resistencia y podrían presentar respuesta al tratamiento (Arendrup et al., 2012, Slater et al., 2011, Lackner et al., 2014).

Algunas especies de *Candida* tienen polimorfismos constitutivos en los genes *FKS*, lo que las hace menos sensibles a las equinocandinas. Ejemplos de este fenómeno son las especies de los complejos de *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* que presentan valores de CMI más elevados en comparación con otras especies de

Candida (Pfaller et al., 2008, Garcia-Effron et al., 2008). Sin embargo, el uso de equinocandinas no es un factor que influya negativamente en la evolución de pacientes infectados con *C. parapsilosis* (Fernandez-Ruiz et al., 2014). En la Tabla 6 se presenta la estructura de aminoácidos de los HS1 y HS2 de los genes *FKS* de las principales especies de *Candida* y los cambios que confieren diferentes grados de resistencia:

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos de los Hot Spot 1 y Hot Spot 2 de los genes *FKS* para las principales especies de *Candida* y posiciones asociadas con resistencia elevada (rojo), débil (verde) y sensibilidad disminuida constitutiva (azul) (Perlin, 2015).

Especie	<i>fks 1</i>		<i>fks 2</i>	
	Hot Spot 1	Hot Spot 2	Hot Spot 1	Hot Spot 2
<i>C. albicans</i>	F ₆₄₁ LTL S LRDP	DWIR R YTL		
<i>C. krusei</i>	F ₆₅₅ LIL S IRDP	DWIR R YTL		
<i>C. glabrata</i>	F ₆₂₅ LIL S IRDP	DWIRRYTL	F ₆₅₉ LIL S LRDP	DWIR R YTL
<i>C. guilliermondii</i>	F ₆₃₂ MAL S IRDP	DWIRRYTL		
<i>C. tropicalis</i>	F...LTL S IRDP	DWIRRYTL		
<i>C. dubliniensis</i>	F ₆₄₁ LTL S IRDP	DWIRRYTL		
<i>C. parapsilosis</i>	F ₆₅₂ LTL S IRDA	DWIRRYTL		

El efecto paradójico es un fenómeno *in vitro* caracterizado por una disminución de la actividad antifúngica a altas concentraciones de equinocandinas (Vanstraelen et al., 2013). La inhibición de la glucano sintasa por parte de las equinocandinas debilita la pared celular de los hongos y crea un estrés celular que induce una cascada de mecanismos adaptativos dirigidos a generar tolerancia a las equinocandinas (Perlin, 2007). El principal mecanismo involucrado en la aparición de este efecto supone un aumento compensatorio en la síntesis de quitina para contrarrestar la depleción de glucanos en la pared (Firon et al., 2004). El impacto clínico del efecto paradójico es aún incierto (Rueda et al., 2017).

5. Estado actual de la resistencia antifúngica

La realización de estudios poblacionales de candidemia permite conocer la epidemiología de la infección y la evolución de las tasas de resistencia antifúngica a lo largo del tiempo en diferentes instituciones y zonas geográficas.

Como se ha mencionado anteriormente, la distribución de especies de *Candida* varía de acuerdo a la región geográfica. A pesar de esas variaciones existe una similitud entre las tasas de resistencia a fluconazol en diferentes países mientras que la resistencia a equinocandinas es más frecuente en algunas regiones. En la Tabla 7 se resumen las tasas de resistencia a fluconazol y equinocandinas en diferentes regiones geográficas provenientes de estudios poblacionales (Prigitano et al., 2016, Cleveland et al., 2015, Doi et al., 2016, Asmundsdottir et al., 2012, Tadec et al., 2016).

Tabla 7. Tasas de resistencia a azoles y equinocandinas publicadas en diversos estudios poblacionales.

País	Resistencia Fluconazol	Resistencia Equinocandinas	Periodo de estudio	Referencia
Italia	5,40%	0,23%	2014-2015	(Prigitano et al., 2016)
Noruega	5,20%	1,80%	2004-2012	(Hesstvedt et al., 2015)
Portugal	5%	3 - 15 %	2011-2012	(Faria-Ramos et al., 2014)
USA	7 - 9%	0,8 - 1,18%	2008-2013	(Cleveland et al., 2015)
Brasil	4,30%	0%	2007-2010	(Doi et al., 2016)
Islandia	2,70%	0%	2000 - 2011	(Asmundsdottir et al., 2012)
España	6 - 6,9%	1,8 - 3,1%	2010 - 2011	(Guinea et al., 2014)
Dinamarca	29%	1,29%	2004 - 2009	(Arendrup et al., 2011)
Dinamarca	32%	2,20%	2003 - 2004	(Arendrup et al., 2005)
Francia	3,40%	0,50%	2004-2010	(Tadec et al., 2016)

Las tasas de resistencia van ligadas a la distribución de especies. En los estudios realizados en Dinamarca, la elevada tasa de resistencia a fluconazol se debe a la alta prevalencia de especies menos susceptibles como *C. glabrata* y *C. krusei* y otras especies de género no *Candida* que se consideraron por definición como no sensibles a fluconazol (Arendrup et al., 2011, Arendrup et al., 2005). Por el contrario, en el estudio poblacional llevado a cabo en Portugal (Faria-Ramos et al., 2014), la alta prevalencia de especies de otros géneros diferentes a *Candida*, como *Trichosporon* spp. y *Cryptococcus* spp., explican la alta tasa de resistencia a equinocandinas que varía entre el 3% y el 15%.

Las tasas de resistencia en España se han estudiado recientemente en el estudio CANDIPOP (Guinea et al., 2014), un estudio poblacional de candidemia realizado durante los años 2010-2011 en el que participaron 29 Hospitales españoles localizados en Madrid, Valencia, Bilbao, Sevilla y Barcelona. En este estudio se incluyeron un total de 781 aislados pertenecientes a 767 pacientes. En general, la resistencia a fluconazol osciló entre 6% y 6,9%, dependiendo de la metodología empleada, y la resistencia a equinocandinas varió entre 1,9% (micafungina) y 3,1%

(anidulafungina). Las tasas de resistencia dependen de la especie estudiada, así para *C. albicans* la resistencia a fluconazol y equinocandinas fue del 1,4% y 0,29% respectivamente; para *C. parapsilosis* la resistencia a fluconazol fue de 2,5% y no se documentó resistencia a las equinocandinas. En *C. glabrata* se encontró una tasa de resistencia a fluconazol del 9,6% y un 1% a equinocandinas. En otros estudios poblacionales, la tasa de resistencia a fluconazol puede verse alterada artificialmente si se consideran resistentes a fluconazol todas las cepas de *C. glabrata*, como es el caso de los estudios poblacionales de Dinamarca (Arendrup et al., 2011, Arendrup et al., 2005). En el caso de *C. tropicalis*, se observó una notable discrepancia en cuanto a las tasas de resistencia a fluconazol según el método de microdilución utilizado, para el CLSI la resistencia fue de 1,7%, mientras que para el EUCAST fue del 22%. Esta discrepancia posiblemente se deba al alto porcentaje de “trailing” presentado por estas cepas. La resistencia a equinocandinas en *C. tropicalis* fue del 3%.

6. Caracterización genotípica de las cepas causantes de candidemia

6.1. Brotes de candidemia

La candidemia es una infección típicamente nosocomial (Diekema et al., 2012). La Organización Mundial para la Salud define las infecciones nosocomiales como aquellas adquiridas durante la estancia hospitalaria (Ducel, 2002). Dado que la incidencia de la candidemia es baja (Pfaller y Diekema, 2007), cuando se observa un incremento en el número de casos en relación a los observados normalmente en una misma unidad y en un determinado periodo de tiempo se debe de levantar la alerta de brote epidémico (Ducel, 2002). En este contexto, la caracterización genotípica de los aislados de *Candida* causantes de infección puede ayudar a esclarecer el foco de la misma, detectar los servicios hospitalarios con transmisión activa y, consecuentemente, mejorar la prevención de esta infección.

El uso de técnicas de tipado molecular permite conocer el genotipo de las cepas y estudiar su relación genética (Pulcrano et al., 2012, L'Ollivier et al., 2012, Da Silva Ruiz et al., 2012). Se define como “clúster” a un grupo de 2 o más aislados que presentan el mismo genotipo. Cuando un mismo genotipo se encuentra infectando dos o más pacientes hay que realizar un estudio detallado de la relación temporal y espacial de los pacientes involucrados en dicho “clúster” para así intentar dilucidar si la infección tiene un foco común, y si puede estar ocurriendo una transmisión activa

ocasionando un brote (Romeo et al., 2013, Diab-Elschahawi et al., 2012, Amouri et al., 2012).

Existen diferencias en la distribución de las especies de *Candida* que causan candidemia en las diferentes unidades del hospital. Estudios previos han demostrado la presencia de “clústers” que involucran hasta el 25% de los pacientes con candidemia causadas por *C. albicans* (Escribano et al., 2013b) y hasta el 50% de los pacientes infectados por *C. parapsilosis* (Escribano et al., 2013a). Estos “clústers” incluyen a pacientes admitidos fundamentalmente en la unidad de neonatología y oncología y algunos pueden llegar a persistir durante años.

Generalmente se han descrito brotes de candidemia en unidades de cuidados intensivos de adultos y neonatales (Pinhati et al., 2016, Roilides et al., 2003, Lin et al., 2012, Da Silva Ruiz et al., 2012, Hernandez-Castro et al., 2010), unidades de hematología (Levin et al., 1998, Brillowska-Dabrowska et al., 2009), unidades quirúrgicas principalmente cardiorácicas (Diab-Elschahawi et al., 2012, Pertowski et al., 1995), y servicios pediátricos como unidades de oncología (Barchiesi et al., 2004).

Aunque las especies involucradas con mayor frecuencia en brotes son *C. parapsilosis* (Brillowska-Dabrowska et al., 2009, Pinhati et al., 2016, Wang et al., 2016, Barchiesi et al., 2004) y *C. albicans* (Pertowski et al., 1995, Lasheras et al., 2007, Guducuoglu et al., 2016), también se han descrito brotes causados por *C. glabrata* (Nedret Koc et al., 2002), *C. krusei* (Gaudie et al., 2009), *C. tropicalis* (Roilides et al., 2003, Chowdhary et al., 2003) y especies menos frecuentes como *C. pelliculosa* (Lin et al., 2012), *C. haemulonii* (Khan et al., 2007), *C. rugosa* (Colombo et al., 2003) y actualmente *C. auris* (Schelenz et al., 2016).

6.2. Vías de transmisión

La colonización del tracto digestivo, respiratorio, o genitourinario por *Candida* spp. es un factor de riesgo importante en la adquisición de candidemia (Miranda et al., 2009). El sobre-crecimiento de *Candida* en el tubo digestivo se ha relacionado con la presencia de candidemia; al igual que la traslocación intestinal posterior a una cirugía abdominal (Miranda et al., 2009, Muskett et al., 2011, Charles et al., 2005). En estos casos la ruta de infección sería endógena y la transmisión paciente-paciente no jugaría un papel tan relevante en el desarrollo de la infección.

El foco de infección primario más frecuentemente relacionado con el desarrollo de la candidemia es el catéter (Dizbay et al., 2008, Miranda et al., 2012, Levin et al., 1998), debido en parte a la habilidad de *Candida* para formar biopelículas y adherirse

a superficies plásticas (Ramage et al., 2005). Se ha descrito que las manos del personal sanitario juegan un papel importante dentro de la transmisión al poderse colonizar por *Candida*, y al manipular el catéter se facilita la colonización del mismo (Barchiesi et al., 2004, Lasheras et al., 2007, van Asbeck et al., 2007). De igual modo se han descrito casos de infusiones parenterales contaminadas por *Candida* que han sido responsables de infecciones (Guducuoglu et al., 2016). En estos casos la transmisión paciente-paciente tendría un papel más relevante.

La incidencia de candidemia en neonatos es elevada (Manzoni et al., 2012) y se considera como factor de riesgo relevante la colonización vaginal de la madre y la subsecuente infección por el canal de parto durante el nacimiento. En este caso la transmisión es vertical (Bliss et al., 2008, Manzoni et al., 2012).

En el momento en que se sospecha la presencia de un brote, la acción inmediata consiste en estudiar los aislados clínicos y ambientales del entorno de los pacientes, incluyendo las manos del personal sanitario, con el fin de conocer la ruta de transmisión de las cepas. Si las cepas aisladas pertenecen a la misma especie, el paso siguiente es emplear técnicas de tipado molecular que constaten que se trata del mismo genotipo y de este modo detectar “clústers” y estudiar las rutas de adquisición y transmisión.

6.3. Técnicas de tipado molecular

Diversas técnicas de tipificación molecular han sido empleadas para el estudio genotípico de aislados de *Candida*. En el Anexo I se adjunta una revisión de la literatura titulada “Use of molecular typing tools for the study of hospital outbreaks of candidemia. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Rev Iberoam Micol. 2014;31 2 :97-103” donde se resumen las principales técnicas de tipado molecular empleadas para el estudio de *Candida* spp clínicamente relevantes.

6.4. Secuenciación del genoma completo como técnica de tipado molecular

La secuenciación del genoma completo permite comparar las diferencias genéticas entre los organismos hasta la resolución de un solo par de bases. Esta técnica se presenta como una nueva técnica de tipado muy esperanzadora para resolver problemas epidemiológicos. Con la introducción en los últimos años de sistemas de secuenciación de alto rendimiento, esta técnica se está volviendo más rápida y menos costosa, por lo que en un futuro es posible que pueda sustituir a los métodos tradicionales de tipado (Price et al., 2013). Hasta la fecha ha demostrado ser

una valiosa herramienta de investigación que puede mejorar la comprensión de la estructura de la población microbiana, evolución, patogénesis, virulencia y resolución de brotes epidémicos (Price et al., 2013). Se ha empleado para el estudio de brotes nosocomiales principalmente bacterianos causados por *Staphylococcus aureus* (Price et al., 2014), *Mycobacterium tuberculosis* (Roetzer et al., 2013), *Escherichia coli* (Holmes et al., 2015), y *Clostridium difficile* (Knetsch et al., 2014); sin embargo, se está empezando a emplear para el estudio de brotes de patógenos fúngicos como *Candida auris* (Lockhart et al., 2017).

7. Patogenicidad de *Candida*

7.1. Virulencia

Candida spp. presenta una variedad de factores de virulencia, permitiendo la colonización de los tejidos en la fase comensal e invasión durante la infección (Hofs et al., 2016). Los factores de virulencia dependen de cada especie, siendo *C. albicans* la especie mejor estudiada. Entre estos destacan, la capacidad de cambiar la morfología de una célula levaduriforme a filamentosa, la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, la formación de biopelículas, y la secreción de enzimas hidrolíticas (Hofs et al., 2016, Mayer et al., 2013).

Las células de *Candida* se adhieren a la superficie de las células huésped mediante la expresión de adhesinas, con la posterior transición de la levadura a hifa y el crecimiento dirigido a través del tigmotropismo (Mayer et al., 2013). La expresión de invasinas media la captación del hongo por la célula huésped a través de endocitosis inducida y la capacidad de adhesión, las fuerzas físicas y la secreción de hidrolasas fúngicas favorecen la penetración activa del hongo a la célula huésped (Mayer et al., 2013).

Además de estos factores, otros atributos relacionados con el “fitness” (acondicionamiento físico) también favorecen a la capacidad de adaptación y de invasión de este patógeno (Hofs et al., 2016, Mayer et al., 2013, Polke et al., 2015). Estos atributos incluyen una rápida adaptación a las fluctuaciones del pH ambiental gracias a la excreción de amoníaco (NH₃) y alcalinización extracelular concomitante, flexibilidad metabólica y absorción de diferentes compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno, y mecanismos robustos de respuesta al estrés efectuados por proteínas de choque térmico (Hsps) (Hofs et al., 2016, Mayer et al., 2013, Polke et al., 2015). La presencia de uno o más factores incrementan la patogenicidad de *Candida* bien sea

favoreciendo la evasión de la respuesta inmune o potenciando el daño hacia las células del huésped.

Una gran variedad de modelos animales se han empleado para estudiar la función del sistema inmune para combatir las infecciones fúngicas, lo que ha contribuido al mejor conocimiento de las interacciones patógeno-hospedador. De igual manera, los modelos animales han ayudado a establecer las características patogénicas de diversos hongos (Trevino-Rangel Rde et al., 2014, Sano et al., 2014, Sandoval-Denis et al., 2014, Paredes et al., 2014, Jacobsen et al., 2014, Fernandez-Silva et al., 2014, Rahman et al., 2012). Los modelos invertebrados son herramientas útiles en el estudio de la patogénesis fúngica y tienen alta correlación con modelo vertebrados (Binder et al., 2016, Jacobsen, 2014, Mesa-Arango et al., 2013, Brennan et al., 2002, Frenkel et al., 2016).

Galleria mellonella (Lepidóptera: Pyralidae, gusano de la miel) es un modelo invertebrado cada vez más utilizado, que por su facilidad de manipulación y su respuesta inmunitaria lo convierten en un huésped ideal para el estudio de enfermedades infecciosas (Jacobsen, 2014, Mesa-Arango et al., 2013), tanto bacterianas (Tsai et al., 2016) como fúngicas (Binder et al., 2016). *G. mellonella* presenta numerosos beneficios, ya que es un modelo fácil de manejar, las larvas pueden incubarse a un rango de temperaturas entre 25 °C a 37 °C, el inóculo puede ser controlado al utilizarse inoculación directa en la hemocele, y la monitorización de la infección es sencilla (Jacobsen, 2014, Binder et al., 2016, Fuchs et al., 2010b). La respuesta inmune de *G. mellonella* es similar a la de los mamíferos, ya que se basa en barreras estructurales pasivas, así como respuestas celulares y humorales que se llevan a cabo por los hemocitos embebidos en la hemolinfa (Wojda, 2016).

Por lo tanto, el uso de este modelo infeccioso está cada vez más extendido en el estudio de la patogénesis de la enfermedad fúngica, y actualmente se ha utilizado para correlacionar la producción de biopelícula *in vitro* – *in vivo* (Rajendran et al., 2015, Borghi et al., 2014b), estudiar el “fitness” en cepas resistentes o con alteraciones que le produzcan adaptación a los antifúngicos (Borghi et al., 2014a, Rueda et al., 2014), estudiar la respuesta antifúngica (Li et al., 2013), y estudiar la patogenicidad de cepas de *C. albicans* (Fuchs et al., 2010a, Frenkel et al., 2016), *C. parapsilosis* (Gago et al., 2014), y *C. tropicalis* (Mesa-Arango et al., 2012), entre otros.

7.2. Formación de biopelículas

Las biopelículas fúngicas son comunidades complejas de células e hifas unidas a un sustrato y protegidas por una matriz extracelular (Fanning y Mitchell, 2012). La formación de biopelículas es parte del proceso patogénico de las infecciones fúngicas por lo que es considerado un factor de virulencia importante; sin embargo, las características más importantes de las biopelículas son su alta capacidad de resistencia a los antifúngicos y a la defensa del propio hospedador, así como la capacidad de perpetuar la infección (Douglas, 2003).

Candida spp. es capaz de formar biopelículas tanto en superficies abióticas, principalmente plásticos, como sobre células y tejidos del hospedador (Douglas, 2003). La resistencia presentada por las biopelículas frente a los antifúngicos representa un importante problema terapéutico ya que involucra a las principales clases de antifúngicos empleados actualmente en la clínica. Existen diversos factores que explican la capacidad de las biopelículas de presentar resistencia frente a los antifúngicos. Las bombas de eflujo juegan un papel importante en la resistencia de las biopelículas de *Candida* frente a azoles, reduciendo la acumulación de antifúngico dentro de las células. La transcripción de los genes *MDR1* y *CDR1* es mayor en biopelículas maduras (24 horas) que en forma planctónica (Ramage et al., 2002).

Otro factor importante son los cambios en la composición de lípidos de la membrana celular. Comparado con la forma planctónica, las membranas celulares de las células en la biopelícula contienen concentraciones de ergosterol más bajas, por lo que limitan la eficacia de fármacos cuya diana es el ergosterol (azoles y anfotericina B). Otro factor clave en la resistencia de las biopelículas es la producción de la membrana extracelular, un material polimérico que promueve la adherencia y protege a las células en la biopelícula de daños ambientales, favoreciendo la retención de nutrientes, agua y enzimas. La matriz extracelular secuestra a los fármacos impidiendo que actúen sobre las células de la biopelícula (Nett et al., 2010); sin embargo, las equinocandinas presentan alta actividad anti-biopelícula, ya que inhiben la síntesis del β 1,3-d-glucano un componente fundamental de la matriz extracelular (Kuhn et al., 2002).

La biomasa y la viabilidad de las biopelículas pueden cuantificarse mediante diferentes métodos microbiológicos, químicos, físicos, moleculares y microscópicos (Azeredo et al., 2016). El método clásico para determinar la viabilidad de las biopelículas es contar el número de unidades formadoras de colonias después de cultivarlas en placas de ágar; sin embargo, este método puede conducir a errores

significativos por el alto grado de agregación debido a la matriz extracelular. Los procedimientos tales como la sonicación o el uso de enzimas que degradan la matriz se puede utilizar para separar las células de la matriz o la superficie a la que están unidos, pero tienen la desventaja de que la viabilidad de las mismas puede verse afectada (Azeredo et al., 2016).

Los ensayos metabólicos son excelentes candidatos para la cuantificación de la viabilidad de las células en la biopelícula. Estos ensayos son métodos indirectos basados en la detección de productos metabólicos producidos por las levaduras y tienen la ventaja de ser capaces de evaluar la viabilidad sin manipulación de la muestra, ya que no requieren la eliminación de la biopelícula de la superficie adherente (Azeredo et al., 2016). Se utilizan diversos indicadores para la detección de la actividad metabólica de la biopelícula. Un ejemplo es el ensayo de reducción de la resazurina (también conocido como el ensayo Alamar Blue), colorante azul que puede ser reducido por las células metabólicamente activas a rosa resorufina, que es fluorescente (O'Brien et al., 2000). Otro de los métodos más usados es el XTT que se basa en la reducción de 2,3-bis (2-metoxi-4-Nitro - 5 - sulfo - fenil) - 2H - tetrazolio - 5 - carboxanilida (XTT) por parte de las células metabólicamente activas; el XTT da lugar a un producto de formazano de color naranja soluble en agua que se puede medir espectrofotométricamente (Pierce et al., 2008). También se han descrito métodos moleculares que permiten cuantificar la viabilidad de las células presentes en la biopelícula mediante qPCR, basándose en la presencia de ADN libre en su superficie (Alvarez et al., 2013).

Otra aproximación para la cuantificación de la biopelícula es el estudio de su biomasa. Se puede cuantificar el grosor de la matriz y estudiar la estructura de la biopelícula, pero esto no da una medida de su viabilidad ya que incluye tanto a las células viables como a las no viables (Azeredo et al., 2016). Los métodos más comunes para el estudio de la biomasa son las técnicas de tinción, como la basada en el uso del cristal violeta. Con esta técnica se realiza una medición indirecta de la biomasa mediante la absorción por parte de la biopelícula del colorante (O'Toole, 2011). La biomasa también puede cuantificarse mediante la cuantificación del peso de la biopelícula, para ello es necesario pesar la superficie donde se forme la biopelícula antes y después de su formación (Azeredo et al., 2016).

Diversos métodos microscópicos pueden emplearse para el estudio de la biopelícula. La microscopia laser confocal combinada con ciertas tinciones específicas permite estudiar la viabilidad de la biopelícula y obtener una idea de la estructura en

tres dimensiones, y también permite estudiar el efecto de antifúngicos sobre la misma (Azeredo et al., 2016). La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite evaluar la estructura de la biopelícula con alta resolución, estudiar efectos de fármacos sobre su estructura y presentar con gran detalle su superficie (Azeredo et al., 2016).

Objetivos



Esta tesis pretendió abordar los siguientes objetivos:

Identificación y sensibilidad a antifúngicos de levaduras causantes de fungemia

1. Determinar la epidemiología de especies causantes de fungemia en pacientes ingresados en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón mediante identificación molecular.
2. Determinar la tasa de resistencia a azoles y equinocandinas en aislados causantes de fungemia.
3. Determinar el porcentaje de cepas que presenten “trailing” a fluconazol y efecto paradójico a las equinocandinas.

Caracterización genotípica y estudio de la diversidad clonal de las principales especies de *Candida* causantes de candidemia

4. Evaluar la clonalidad de las cepas causantes de candidemia, incluida la candidemia relacionada con el catéter, producidas por las principales especies de *Candida*.
5. Estudiar la diversidad genotípica de las principales especies de *Candida* causantes de fungemia y la relación con la transmisión nosocomial.

Estudio de la formación de biopelículas en aislados de *Candida* spp. causantes de fungemia y determinación de su sensibilidad antifúngica

6. Determinar la capacidad de formar biopelículas en levaduras causantes de fungemia y proponer una clasificación en base a su biomasa y su actividad metabólica.
7. Estudiar la sensibilidad antifúngica de las biopelículas formadas por especies de *Candida* con gran capacidad de formar biopelículas.

Estudio de la patogenicidad de *Candida* spp. en base a la letalidad sobre un modelo de *G. mellonella*

8. Determinar la letalidad causada por cepas de *C. albicans* causantes de fungemia y crear una clasificación en base a su virulencia.
9. Comparar la patogenicidad de *C. guilliermondii* y *C. albicans* y su relación con la evolución clínica de los pacientes.

Justificación



Identificación y sensibilidad a antifúngicos de levaduras causantes de fungemia

La candidemia es una causa importante de morbilidad y mortalidad en el entorno hospitalario. A pesar de que *C. albicans* es la principal especie causante de candidemia, otras especies de *Candida* – o incluso otros géneros – caracterizados por presentar una sensibilidad disminuida a los antifúngicos, están cobrando una mayor relevancia clínica. El conocimiento de la epidemiología de las especies causantes de candidemia es de gran importancia en el entorno clínico, ya que los patrones de sensibilidad antifúngica son especie-específicos. Esto cobra especial interés a la hora de iniciar tratamiento empírico cuando aún no se ha identificado el aislado. Otro aspecto importante es la determinación de la sensibilidad antifúngica, sobre todo en casos de aislados pertenecientes a especies normalmente sensibles y que pueden presentar resistencia adquirida. La técnica de referencia para la determinación de la sensibilidad antifúngica es la microdilución en caldo y tanto el CLSI como el EUCAST han estandarizado sus correspondientes metodologías para obtener resultados comparables y reproducibles. Gracias a estos métodos, y a la presencia de puntos de corte, se pueden determinar las tasas de resistencia a antifúngicos para la mayoría de cepas causantes de candidemia. La mayoría de estudios reportan las tasas de resistencia globales en las cepas estudiadas. Sin embargo, no abundan estudios que evalúen la evolución de las tasas de resistencia a antifúngicos en las cepas causantes de candidemia a lo largo del tiempo.

Las técnicas de microdilución estándar no están disponibles en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. Dada la necesidad de obtener la sensibilidad antifúngica de las cepas con significación clínica, es necesario contar con métodos comerciales que permitan de modo sencillo obtener esta información, sobre todo para antifúngicos de amplio uso hospitalario como es el caso de fluconazol y las equinocandinas. El E-test es uno de estos métodos comerciales, pero su papel como herramienta para establecer la sensibilidad de las cepas de *Candida* a las equinocandinas está poco estudiado.

El uso de técnicas de microdilución ha permitido observar la presencia de ciertos fenómenos *in vitro* que pueden interferir a la hora de establecer la CMI de los fármacos. Estos fenómenos son el efecto de arrastre del fluconazol (“trailing”) y el efecto paradójico a las equinocandinas, fenómenos poco estudiados y fundamentalmente descritos con el uso de la metodología del CLSI. La lectura espectrofotométrica de los paneles cuando se usa el procedimiento de EUCAST

permite establecer una gradación de la producción de estos fenómenos por parte de las cepas estudiadas. Hasta la fecha, el grado de producción de efecto de arrastre a fluconazol y efecto paradójico a las equinocandinas por parte de las cepas causantes de candidemia medido por la metodología del EUCAST es desconocido.

Caracterización genotípica y estudio de la diversidad clonal de las principales especies de *Candida* causantes de candidemia.

La candidemia afecta principalmente a pacientes hospitalizados generalmente en unidades de cuidados intensivos y neonatología. Ante un aumento en el número de casos de candidemia es necesario esclarecer si existe una posible transmisión de *Candida* spp., lo que probablemente podría traducirse en brotes nosocomiales.

La caracterización genotípica de los aislados de *Candida* puede ayudar a esclarecer también el origen de la infección. La definición de candidemia relacionada con el catéter se basa en el aislamiento de la misma especie de *Candida* tanto en el cultivo de la punta del catéter como en el hemocultivo. Se desconoce si esta definición basada meramente en identidad de especies es suficiente, y además se desconoce si se trata de una infección policlonal, es decir, si la infección está causada por uno o varios genotipos, o si los genotipos encontrados en el catéteres son siempre idénticos a aquellos encontrados en sangre y viceversa. De ser así, podría ser necesario apoyarse en los métodos moleculares para definir la candidemia relacionada con el catéter requiriendo que los genotipos encontrados tanto en los hemocultivos como en la punta del catéter sean idénticos. Actualmente en la literatura existen pocos trabajos donde se estudien genotípicamente los aislados procedentes de pacientes con candidemia relacionada con el catéter; además los pocos estudios existentes se llevaron a cabo con métodos moleculares poco discriminativos.

La caracterización molecular puede ser también útil para conocer la potencial transmisión nosocomial de las cepas de *Candida* dentro del hospital, o establecer aquellas unidades con una hipotética mayor transmisión en las que se pueda actuar para prevenir la transmisión del patógeno. Se desconoce el porcentaje de cepas que comparten el mismo genotipo en diferentes hospitales y si este parámetro puede sugerir transmisión horizontal entre pacientes.

Estudio de la formación de biopelículas por parte de aislados de *Candida* spp. causantes de fungemia y determinación de su sensibilidad a antifúngicos

La habilidad de *Candida* spp. para formar biopelículas le permite adherirse a superficies plásticas como catéteres y causar infecciones relacionadas a estos

dispositivos. Las guías actuales de manejo de la candidemia sugieren la retirada del catéter cuando se sospeche que éste es el foco de infección, sin embargo en algunos casos esto no es posible. Algunas técnicas alternativas, como el sellado del catéter con antifúngicos, utilizan altas concentraciones de antifúngicos para erradicar el foco y así evitar la retirada del catéter. Sin embargo, no hay suficiente evidencia clínica al respecto, por lo que el conocimiento de la capacidad de formación biopelículas que presentan las distintas especies y la sensibilidad antifúngica de las mismas es de gran importancia.

Actualmente no existe un consenso sobre qué técnica debe emplearse para la cuantificación de las biopelículas de *Candida*, y de cómo clasificar las cepas en base a la capacidad de formar biopelículas; también se desconoce si diferencias en las características de la biopelícula influyen en la susceptibilidad antifúngica de la misma.

Estudio de la patogenicidad de *Candida* spp. en base a la letalidad sobre el modelo de *G. mellonella*.

Además de los factores predisponentes del paciente para el desarrollo de candidemia, existen factores de virulencia propios de cada especie que favorecen el desarrollo y el pronóstico de la infección. Entre estos destacan la producción de biopelículas, así como la producción de proteinasas y otras enzimas que favorecen la adhesión y posterior invasión. El estudio de la patogenicidad de las cepas de *Candida* spp. podría tener un impacto en la monitorización de la evolución clínica de los ntes. Actualmente se están empleando modelos invertebrados que facilitan el estudio de un gran número de cepas; por ejemplo, las larvas de *G. mellonella* se han usado para estudiar la virulencia de algunas especies fúngicas como *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. mostrando una alta correlación con modelos vertebrados.

Si bien los factores de riesgo para el desarrollo de candidemia causadas por las especies de *Candida* más frecuentes son bien conocidos, la epidemiología de las infecciones causadas por especies poco frecuentes no lo son tanto. Las especies infrecuentes como *C. guilliermondii* se caracterizan por presentar una sensibilidad disminuida a antifúngicos. El modelo de *G. mellonella* podría ser de utilidad para estudiar la potencial virulencia de aislados pertenecientes a estas especies poco frecuentes.

El modelo de *G. mellonella* se ha utilizado para estudiar la letalidad de cepas de *C. albicans* con diferentes grados de producción de biopelícula, sin embargo, el número de aislados analizados son reducidos, y no se ha establecido una clasificación

que diferencie a las cepas de una misma especie en base a su letalidad. Otro aspecto interesante que permite estudiar este modelo invertebrado es la posible relación entre la letalidad de las cepas y la evolución clínica de los pacientes.

Material y Métodos



1. Descripción del Hospital

Las cepas estudiadas provienen de pacientes ingresados en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón, ubicado en Madrid, España. El hospital atiende a una población aproximada de 715.000 habitantes e incluye a todos los tipos de pacientes con riesgo de desarrollar candidemia, como aquellos con neoplasias malignas hematológicas, receptores de trasplante de órgano sólido, pacientes portadores de catéteres venosos centrales, pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos médicos y quirúrgicos, y neonatos.

2. Definiciones clínicas

2.1. Episodio de fungemia

La fungemia se definió como el aislamiento de levaduras en botellas de hemocultivos inoculadas con sangre obtenida por venopunción de una vía periférica de pacientes con sospecha de sepsis. Se definieron episodios múltiples en un solo paciente cuando se aisló la misma especie en posteriores hemocultivos tomados ≥ 7 días después del último hemocultivo positivo.

2.2. Infección polifúngica

Los episodios en los que se detectaron 2 o más especies diferentes de levaduras se consideraron infecciones polifúngicas.

2.3. Otras definiciones clínicas

Las definiciones utilizadas han sido publicadas previamente (Puig-Asensio et al., 2013, Puig-Asensio et al., 2014). Brevemente, los episodios detectados durante los dos primeros días de ingreso hospitalario se consideraron como ambulatorios; estos episodios también podrían clasificarse como relacionados con la atención de la salud si los pacientes cumplían cualquiera de los siguientes criterios: hospitalización por ≥ 2 días en los 90 días anteriores a la candidemia, residencia en un centro de larga estancia, o recepción de quimioterapia o diálisis en los 30 días anteriores a diagnóstico (Friedman et al., 2002). Los criterios para el diagnóstico de candidemia relacionada con el catéter fueron los establecidos en las guías de la IDSA (Mermel et al., 2009). Los focos secundarios requerían el aislamiento de la misma especie de *Candida* en la fuente sospechosa de infección. Los episodios de candidemia de brecha se definieron como candidemia en pacientes que habían estado recibiendo antifúngicos durante

más de 3 días. La presencia de sepsis grave o shock séptico se registró en el día en que se diagnosticó la candidemia (Levy et al., 2003, Goldstein et al., 2005). Se definió un tratamiento antifúngico adecuado como la dosis correcta de agente antifúngico para un aislado de *Candida* susceptible administrado dentro de las primeras 48 horas tras la recogida de sangre. La retirada temprana del catéter venoso central se realizó en las primeras 48 horas después del cultivo positivo. En pacientes con múltiples catéteres, al menos el catéter responsable tuvo que ser retirado dentro de este plazo.

3. Aislados clínicos estudiados

3.1. Cepas provenientes de hemocultivos de pacientes ingresados en el Hospital Gregorio Marañón

Se estudiaron 764 levaduras provenientes de hemocultivos de 686 pacientes, ingresados en el hospital Gregorio Marañón desde enero de 2007 a septiembre de 2016. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante procedimientos estándar y se incubaron en botellas incubadas en el sistema automatizado Bactec 9240 (2007-2011) y BactecTM-FX (2011-2016) (Becton-Dickinson, Cockeysville, Maryland, EE.UU). Las botellas de hemocultivos con crecimiento positivo y con presunta visualización de levaduras en la tinción de Gram se subcultivaron en placas de CHROMagar (CHROMagar, París, Francia) que se incubaron durante 36-48 horas a 35 °C con objeto de detectar fungemias polifúngicas. Todas las especies presentes en las placas se subcultivaron de manera independiente y los aislados se identificaron por amplificación y secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 (White, 1990).

3.2. Cepas de otros orígenes, con características especiales, o provenientes de otros centros

3.2.1. Cepas ATCC

Se utilizaron las cepas tipo *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 como control de calidad para las pruebas de sensibilidad antifúngica. También se incluyó la cepa *C. albicans* ATCC 90028 dada su alta y conocida producción de efecto arrastre (St-Germain, 2001).

3.2.2. Cepas con mutaciones en los genes *fks*

Se incluyeron 5 cepas con mutaciones en los genes *fks*, de las cuales 4 fueron recogidas en el estudio poblacional CANDIPOP llevado a cabo en los años 2010 – 2011 (Guinea et al., 2014), y otra fue aislada de un hemocultivo de un paciente con

candidemia ingresado en el hospital Gregorio Marañón. Las cepas incluidas se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas con mutaciones en los genes *fks* previamente descritas en el estudio CANDIPOP (Guinea et al., 2014) o en pacientes del hospital Gregorio Marañón que fueron incluidas en esta tesis doctoral.

Especie	Mutación	Región	Origen
<i>Candida glabrata</i>	ΔF649	HS1 <i>fks</i> 2	CANDIPOP
<i>Candida albicans</i>	F641S	HS1 <i>fks</i> 1	CANDIPOP
<i>Candida tropicalis</i>	F641L	HS1 <i>fks</i> 1	CANDIPOP
<i>Candida tropicalis</i>	R647G	HS1 <i>fks</i> 1	Hospital Gregorio Marañón
<i>Candida tropicalis</i>	S645F	HS1 <i>fks</i> 1	CANDIPOP

3.2.3. Cepas originadas en el catéter

Para el estudio retrospectivo de candidemia relacionada con el cateter, se estudiaron 22 pacientes ingresados entre enero 2008 y diciembre 2010 en los que *C. albicans* fue aislada simultáneamente de hemocultivos y puntas de catéter durante los 7 días anteriores o posteriores a la toma del hemocultivo. Se estudiaron 48 cepas de *C. albicans* procedentes de hemocultivos (n = 22) y cultivos de punta de catéter (n = 26). Como controles, se estudiaron 10 cepas de *C. albicans* de hemocultivos de 10 pacientes sin candidemia relacionada con el catéter.

Para el estudio prospectivo de candidemia relacionada con el catéter, se estudiaron 20 pacientes ingresados entre julio de 2011 y agosto de 2012 en los que se aisló *C. albicans* (n = 9), *C. parapsilosis* (n = 7), *C. glabrata* (n = 2), o *C. albicans* + *C. glabrata* (n = 2) simultáneamente en hemocultivos y cultivos de puntas de catéter durante los 7 días anteriores o posteriores a la toma del hemocultivo. Se estudiaron 20 hemocultivos obtenidos de punción venosa periférica (uno por paciente) y 31 muestras de catéter (segmentos de catéter, reservorios y cultivos de la piel alrededor del sitio de inserción). En la mayoría de los pacientes (n = 15), sólo se estudió una muestra de catéter; en los cinco pacientes restantes se procesaron varias muestras (rango 2-4).

Los procedimientos y definiciones de cultivo de punta de catéter se basaron en las directrices de la IDSA (Mermel et al., 2009). Para ello, las puntas de catéter enviadas al servicio de Microbiología se rodaron sobre placas de agar de sangre de acuerdo con la técnica de placa laminar semicuantitativa (Maki et al., 1977). Los aislados de *Candida* spp. presentes en recuentos de ≥ 15 unidades formadoras de colonias fueron identificados a nivel de especie.

Se usaron los siguientes procedimientos conservadores de estudio de colonización de catéteres que estaban insertados en el paciente en el momento de la recolección de muestras: tinción de Gram y cultivo de líquido endoluminal del catéter (Kite et al., 1999), o cultivo del interior del reservorio y/o la piel alrededor del punto de inserción (Cercenado et al., 1990). Cuando el cultivo de un catéter por el procedimiento de Maki era negativo, el segmento se seccionó longitudinalmente y se frotó en la superficie de una placa de agar de sangre.

3.2.4. Cepas procedentes de pacientes ingresados en otros centros

Para el estudio de la diversidad clonal de la candidemia en diferentes hospitales, se incluyeron cepas de *C. albicans* (n=63) y *C. parapsilosis* (n=30) provenientes de pacientes ingresados en el hospital Ramón y Cajal desde enero 2010 a diciembre 2012. Las muestras de hemocultivo se obtuvieron utilizando procedimientos estándar y se incubaron en el sistema automatizado Bactec 9240 (a partir de 2010) y Bactec™ -FX (2011-2012) Becton-Dickinson, Cockeysville, MD, EUA. Los cultivos de sangre con visualización de levaduras en la tinción de Gram se subcultivaron en agar CandiSelect (BioRad, Marnes La Coquette, Francia) que se incubaron durante 24-48 horas a 35-37 °C. La identificación presuntiva fue confirmada por espectrometría de masas en un sistema Microflex LT (Daltonik, Bremen, Alemania) (Huang et al., 2013). Como control, se incluyeron cepas (*C. albicans*, n = 89, *C. parapsilosis*, n = 46) de hemocultivos de pacientes ingresados en un hospital geográficamente no relacionado, el hospital Policlínico Universitario Agostino Gemelli, Roma, Italia, durante el período de estudio.

3.2.5. Cepas de *C. guilliermondii*

Para estudiar las características de la candidemia causada por *C. guilliermondii*, además de las cepas de esta especie aisladas en los hemocultivos de pacientes ingresados en el Hospital Gregorio Marañón durante el periodo de estudio mencionado, se incluyeron cepas aisladas de pacientes ingresados en el Hospital de Vall d'Hebron, Barcelona (n = 5) durante el periodo de 2007 a 2014. También se incluyeron los casos recogidos en los restantes hospitales participantes en el estudio poblacional CANDIPOP (n = 8) (Guinea et al., 2014).

4. Pruebas de sensibilidad antifúngica

4.1. EUCAST EDef 7.2

Se utilizó el procedimiento de microdilución EUCAST EDef 7.2 (Arendrup et al., 2012a) para estudiar la sensibilidad *in vitro* a los siguientes fármacos: anfotericina B (Sigma Aldrich, Madrid, España), fluconazol, voriconazol y anidulafungina (Pfizer Pharmaceutical Group, Nueva York, Nueva York, EE.UU.), posaconazol y caspofungina (Merck & Co., Inc, Rahway, New Jersey, EE.UU.), y micafungina (Astellas Pharma, Inc, Tokio, Japón) (2008a, Arendrup et al., 2012a). Los agentes antifúngicos se estudiaron a concentraciones que oscilaban entre 0,015 y 8 µg/ml (anfotericina B, voriconazol, posaconazol, caspofungina, anidulafungina y micafungina), ó 0,062 y 64 µg/ml (fluconazol). Los estudios se realizaron en placas de microdilución de fondo plano, utilizando medio RPMI 1640 2X suplementado con 2% de glucosa. El método se basa en la preparación de soluciones de trabajo con concentraciones crecientes de antifúngicos en volúmenes de 100 µl por pocillo a los que se añaden 100 µl de inóculo. En los pocillos 1 a 10 de cada columna de la placa se dispensaron 100 µl de la concentración de agente antifúngico (2X concentración final). En los pocillos de la columnas 11 y 12 se dispensaron 100 µl de medio RPMI 2X que se usaron como blanco (pocillo 12) y como control de crecimiento de levadura libre de fármaco (pocillo 11). El inóculo se preparó suspendiendo cinco colonias representativas de la levadura a estudiar en agua destilada estéril, para ello se preparó una suspensión al 0,5 McFarland que equivale a $1-5 \times 10^5$ UFC/ml; posteriormente se inocularon 100 µl de la suspensión, lo que dio lugar a la concentración de fármaco final requerida y la densidad del inóculo inoculo final de $0,5 - 2,5 \times 10^5$ UFC/ml.

Las placas inoculadas se incubaron durante 24 horas a 35 °C. El control de crecimiento debió alcanzar una densidad óptica $> 0,2$; en caso contrario, las placas se incubaron 24 horas adicionales. Las levaduras de géneros diferentes a *Candida* que no fermentan la glucosa se incubaron en agitación a 30 °C.

La CMI se definió como la concentración más baja de fármaco resultante en una inhibición de $\geq 50\%$ de crecimiento en comparación con un control libre de fármaco (fluconazol, voriconazol, posaconazol y equinocandinas), o $\geq 90\%$ (anfotericina B). El valor de CMI se determinó espectrofotométricamente (fotómetro de microplaca Multiskan FC, Thermo Scientific, Madrid, España) con lecturas realizadas a 530 nm.

4.2. E-test de micafungina

Se utilizaron tiras de E-test que contenían micafungina en concentraciones comprendidas entre 0,002 y 32 µg/ml. El procedimiento se realizó según las recomendaciones del fabricante, en placas de agar de RPMI-glucosa 1640-2% que se inocularon usando un hisopo sumergido en una suspensión de levadura previamente ajustada a la turbidez de un patrón de 0,5 McFarland. La tira E-test se colocó sobre la placa inoculada una vez que la superficie del agar estaba completamente seca. Las placas se incubaron a 35 °C y se leyeron después de 24-48 horas de incubación. El valor de CMI se definió como la concentración más baja de micafungina en la que la zona de inhibición intersectaba la tira plástica; la presencia de microcolonias en la zona de inhibición no se tuvo en cuenta.

4.2.1. Comparación entre procedimientos

Utilizando como “gold standard” las CMIs obtenidas mediante el procedimiento EUCAST después de 24 horas de incubación se compararon los resultados obtenidos con el E-test después de 24 y 48 horas de incubación. Los resultados fuera de escala obtenidos usando el E-test se transformaron a la siguiente dilución más alta que coincidió con la escala utilizada por el EUCAST. El acuerdo esencial se definió como las discrepancias de no más de ± 2 diluciones entre ambos procedimientos. El acuerdo categórico se analizó tomando en cuenta los puntos de corte específicos o los ECOFFs para cada especie. Las discrepancias se consideraron como falsa susceptibilidad cuando el E-test clasificó una cepa como susceptible y el EUCAST como resistente, y falsa resistencia cuando una cepa fue clasificada como resistente por el método de E-test y susceptible por EUCAST (Guinea et al., 2007).

4.3. Interpretación de la sensibilidad a antifúngicos

Los aislados de *Candida* se clasificaron como resistentes (R), intermedios (I) o sensibles (S) según los puntos de corte clínicos específicos de especie, o como tipo salvaje/no salvaje de acuerdo a los puntos de corte epidemiológicos ECOFFs propuestos por EUCAST (Arendrup et al., 2014a). El documento de EUCAST no proporciona puntos de corte clínicos o ECOFF para caspofungina debido a las altas variaciones inter-laboratorio reportadas (Espinel-Ingroff et al., 2013), por lo tanto, no se muestran tasas de resistencia a este fármaco.

El punto de corte para anfotericina B fue $R > 1$ µg/ml para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*. Los puntos de corte no específicos de especie para fluconazol (todas las especies de *Candida*) fueron $S \leq 2$ µg/ml, $I = 4$

$\mu\text{g/ml}$, y $R \geq 8 \mu\text{g/ml}$, con excepción de *C. glabrata* ($I = 0,062 - 32 \mu\text{g/ml}$, y $R > 32 \mu\text{g/ml}$), y *C. krusei*, que se consideró intrínsecamente resistente al fluconazol. Para el voriconazol, los puntos de corte fueron $R > 0,125 \mu\text{g/ml}$ (*C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*) y $R > 1 \mu\text{g/ml}$ (*C. glabrata*, *C. krusei*, tentativamente basado en ECOFF) (2008b). Los puntos de corte para posaconazol fueron $R > 0,06 \mu\text{g/ml}$ (*C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*), $R > 0,5 \mu\text{g/ml}$ (*C. krusei*, basado provisionalmente en ECOFF) y $R > 1 \mu\text{g/ml}$ (*C. glabrata*, provisionalmente basado en ECOFF) (Arendrup et al., 2011). En el caso de la micafungina, los puntos de corte usados fueron $> 0,015 \mu\text{g/ml}$ (*C. albicans*, $R > 0,03 \mu\text{g/ml}$, *C. glabrata*, $R > 2 \mu\text{g/ml}$, *C. parapsilosis*, $R > 0,06 \mu\text{g/ml}$, *C. tropicalis*, y $R > 0,25 \mu\text{g/ml}$ *C. krusei*, (basado provisionalmente en ECOFF) (Arendrup et al., 2014b). Los puntos de corte para anidulafungina fueron $R > 0,03 \mu\text{g/ml}$ (*C. albicans*), $R > 0,06 \mu\text{g/ml}$ (*C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*) y $R > 4 \mu\text{g/ml}$ (*C. parapsilosis*).

En ausencia de puntos de corte para especies diferentes a *Candida*, se usaron puntos de corte provisionales; para fluconazol se usaron los puntos de corte no relacionados con especies ($R \geq 8 \mu\text{g/ml}$), excepto para *Cryptococcus neoformans*, que se consideró resistente a fluconazol si su CMI fue $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ (Aller et al., 2000). *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp., *Arxula* spp. y *Cryptococcus neoformans* se consideraron intrínsecamente resistentes a las equinocandinas. No se calcularon las tasas de resistencia para las combinaciones de fármaco-especie restantes. Los aislados que mostraban resistencia a uno o más agentes antifúngicos se volvieron a analizar para confirmar la CMI.

4.4. Cálculo del efecto arrastre o “trailing”

El efecto arrastre se definió como la presencia de crecimiento residual en pocillos que contenían concentraciones de fluconazol por encima de la CMI. Para cada aislado, se calculó el porcentaje de efecto arrastre detectado en cada pocillo, comenzando con el primer pocillo que contenía una concentración doble por encima de la CMI y terminando con el pocillo que contenía $64 \mu\text{g/ml}$ de fluconazol.

También se calculó la media de efecto arrastre, como la media geométrica del porcentaje de recrecimiento observado en todos los pocillos por encima de la CMI. Se clasificaron las cepas de acuerdo con la media de efecto arrastre como efecto arrastre residual (0,1 a 5% de crecimiento residual), efecto arrastre ligero (6 a 10% de crecimiento residual), efecto arrastre moderado (11-15% de crecimiento residual) y efecto arrastre alto ($> 15\%$ de crecimiento residual).

En la Figura 1 se muestran tres aislados clasificados de acuerdo al efecto arrastre presentado según el procedimiento EUCAST.

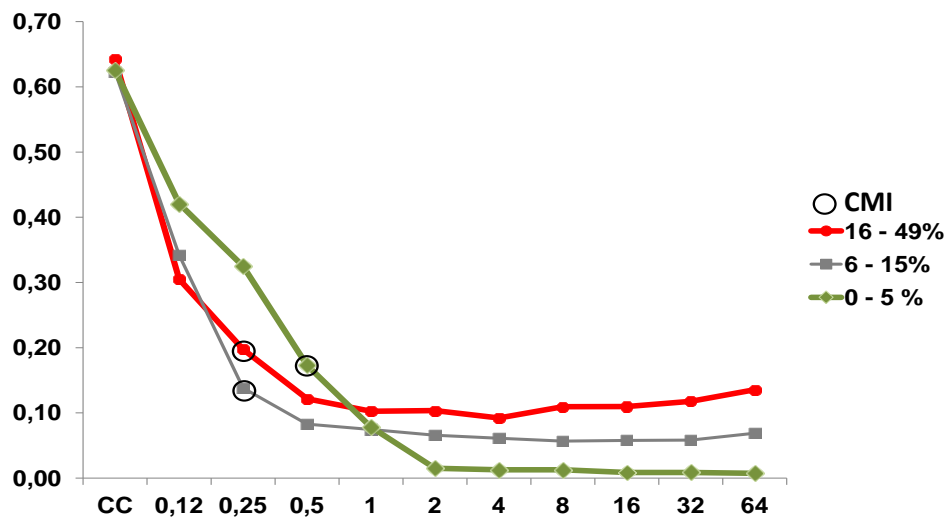


Figura 1. Ejemplo de tres aislados que muestran diferentes grados de efecto arrastre a fluconazol medido por EUCAST EDef 7.2 según la clasificación propuesta.

4.5. Determinación del efecto paradójico.

El efecto paradójico se definió como un aumento de la densidad óptica de 0,02 comparado con el control del crecimiento en pocillos que contenían una concentración de equinocandina al menos dos diluciones por encima de la CMI (Figura 2). Esta definición fue adaptada de un estudio previo (Rueda et al., 2014).

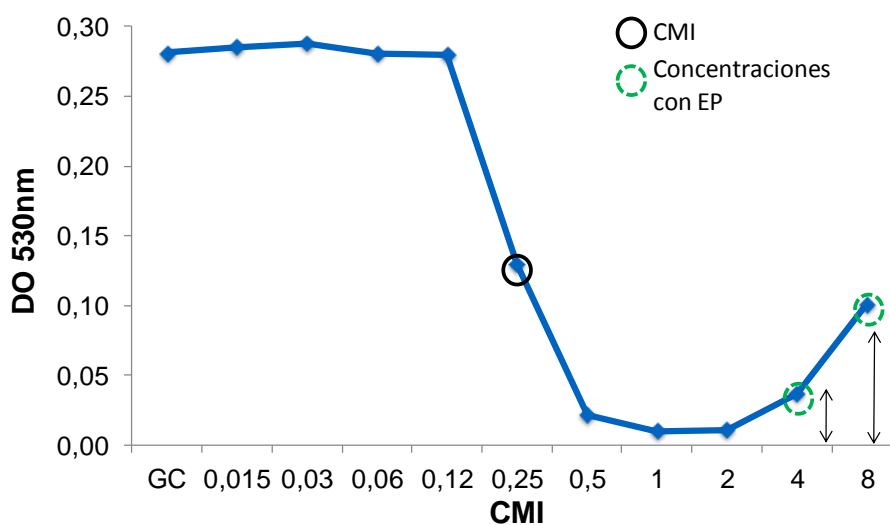


Figura 2. Ejemplo de un aislado que muestra el efecto paradójico (EP) a caspofungina en las concentraciones de 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$.

5. Estudios moleculares para la realización de caracterizaciones microbiológicas complejas

5.1. Identificación molecular de levaduras

La identificación molecular se llevo a cabo según el protocolo de White y colaboradores (White, 1990). Para ello se emplean los cebadores ITS1 e ITS4 a concentración final de 5 μ M, dNTPs 25 mM, Cl₂Mg 25mM, 5u/ μ l de Taq polimerasa, para un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de PCR fueron: un paso inicial durante 5 minutos a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C , 45 segundos a 50 °C, 2 minutos a 75 °C, y finalmente un paso de extensión de 5 minutos a 72 °C. Las secuencias fueron ensambladas y editadas usando los programas de software SeqMan II y EditSeq Lasergene (DNASTar, Madison, Wisconsin, EE.UU).

5.2. Caracterización de mutaciones en los genes *FKS*

Para *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* se secuenciaron las regiones hot spot 1 (HS1) y hot spot 2 (HS2) del gen *FKS1*, mientras que para *C. glabrata* se secuenciaron los HS1 y HS2 de los genes *FKS1* y *FKS2*. La PCR se realizó directamente sobre aislados en cultivo puro sin necesidad de extracción de ADN previa.

Para *C. albicans* (Garcia-Effron et al., 2009) y *C. tropicalis* (Desnos-Ollivier et al., 2008) se utilizaron los cebadores universales *FKS1* (HS1 y HS2) previamente descritos. Para *C. glabrata*, se usaron los primers descritos previamente (Duran-Valle et al., 2012). Las condiciones de PCR para *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei* fueron las siguientes: un paso inicial de 10 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, con un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Para *C. tropicalis*, fueron las siguientes: inicial 10 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, con un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Las secuencias fueron ensambladas y editadas usando los programas de software SeqMan II y EditSeq Lasergene (DNASTar, Madison, Wisconsin, EE.UU).

5.3. Genotipado mediante microsatélites

5.3.1. Genotipado de *C. albicans*

Las cepas de *C. albicans* fueron genotipadas utilizando un panel de 6 marcadores de los microsatélites CDC3, EF3 y HIS3 (Sabino et al., 2010, Botterel et

al., 2001) y CAI, CAIII y CAVI (Sampaio et al., 2005) previamente descritos. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso inicial de 10 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto, con un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

5.3.2. Genotipado de *C. parapsilosis*

Los marcadores de microsatélites utilizados para *C. parapsilosis* fueron CP1, CP4a, CP6 y B (Sampaio et al., 2003, Vaz et al., 2011). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso inicial 2 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 30 segundos a 55 °C, y 1 minuto a 72 °C, con un paso de extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

5.3.3. Genotipado de *C. glabrata*

Para *C. glabrata* se usaron 5 marcadores: ERG, MTI, GLM4, GLM5 y CG10 siguiendo las condiciones previamente publicadas (Foulet et al., 2005, Grenouillet, 2007, Abbes et al., 2011): 5 minutos iniciales a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 2 minutos, con un paso de extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

5.3.4. Genotipado de *C. tropicalis*

El tipado de *C. tropicalis* se realizó con los 6 marcadores microsatélites Ctmr1, Ctmr10, Ctmr12, Ctmr21, Ctmr24, Ctmr28 (Wu et al., 2014). Los marcadores Ctmr1, Ctmr10, Ctmr12 se amplificaron mediante PCR touchdown con 4 minutos iniciales a 94 °C, 15 ciclos de 94 °C durante 45 segundos, 59 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 50 °C y 1 minuto a 72° C, con un paso de extensión final a 72° C durante 10 minutos. Para los marcadores Ctmr21, Ctmr24, Ctmr28 las condiciones fueron las siguientes: 15 minutos iniciales a 95° C, 35 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 57° C durante 90 segundos y 72 °C durante 1 minuto, con un paso de extensión final a 60 °C durante 30 minutos.

La electroforesis capilar se llevó a cabo en un analizador 3130xl (Applied Biosystems-Life Technologies Corporation, California). Los tamaños de los alelos se determinaron automáticamente usando el programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems-Life Technology Corporation, CA). Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

5.4. Análisis genético de diversidad

Para cada marcador microsatélite se estableció la composición alélica de cada aislado y el número total de alelos. El tamaño de los alelos se estimó en pares de bases. *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* al ser diploides se clasificaron como heterocigotas (presencia de los alelos por marcador) y homocigotas (presencia de un único alelo por marcador); sin embargo, en *C. glabrata* al ser una especie haploide sólo se observó un solo alelo en cada marcador. Se calcularon los siguientes parámetros de diversidad: el número de alelos por locus, heterocigosidad observada H_o (recuento directo calculado como el número de genotipos heterocigotos sobre el número total de genotipos analizados para cada locus); heterocigosidad esperada ($H_e = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia del i -ésimo alelo) (Nei, 1973), índice de fijación de Wright [$F = 1 - H_o / H_e$], que muestra las relaciones entre H_o y H_e y detecta un exceso o deficiencia de heterocigotos (Lenardon y Nantel, 2012), y finalmente, la probabilidad de identidad de individuos no relacionados [$PI = 1 - \sum p_i^4 + \sum \sum 2p_i p_j^2$], donde p_i y p_j son las frecuencias de los i -ésimo y j -ésimo alelos, respectivamente], que mide la probabilidad de que dos genotipos diploides escogidos al azar sean idénticos (Paetkau et al., 1995). La probabilidad de identidad se calculó con el programa IDENTITY 1.0 (Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna) y el resto de parámetros con el programa ARLEQUIN versión 3.01 (Excoffier et al., 2005).

Los resultados del genotipado se convirtieron en datos binarios marcando la presencia o ausencia de cada alelo para cada marcador. Los datos fueron tratados como categóricos, y la relación genética entre todos los genotipos se estudió mediante la construcción de un “Minimum Spanning Tree” (BioNumerics versión 6.6, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Se consideró que los aislados tenían genotipos idénticos cuando mostraban los mismos alelos para todos los loci. Un “cluster” se definió como el mismo genotipo infectando ≥ 2 pacientes.

6. Formación de biopelículas

La formación biopelículas se realizó de acuerdo con el método propuesto por Pierce con algunas modificaciones (Pierce et al., 2008). Para ello, los aislados se cultivaron en placas de Sabouraud dextrosa ágar durante 24 horas a 35 °C. Se inoculó un asa cargada en 10 ml de caldo YPD (extracto de levadura, dextrosa peptona) (Difco, Becton Dickinson, Madrid, España), que luego se incubó con agitación a 160

rpm en un agitador orbital Stuart mini (BioCote, Coventry, UK) durante una noche a 30 °C. Posteriormente se realizaron dos lavados con 10 ml de PBS mediante centrifugación a 3.000 g durante 5 minutos. Por último las células lavadas se resuspendieron en 10 ml de medio de caldo RPMI 1640; la suspensión se ajustó a una turbidez de McFarland de 0,35 en RPMI (aproximadamente 1×10^6 células/ml) usando un nefelómetro (Dinko Instruments, España). Se inocularon 100 µl de la suspensión en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Las células planctónicas se descartaron después de 3 lavados con 100 µl de una solución de PBS, y las placas con las biopelículas preformadas se colocaron boca abajo hasta su completo secado. Cada cepa se ensayó por triplicado.

6.1. Estudio de la biomasa de la biopelículas mediante tinción de cristal violeta

La biomasa de la biopelícula se cuantificó según el protocolo descrito previamente por O'Toole y colaboradores (O'Toole, 2011). Para ello, a las biopelículas previamente formadas, se le añadieron 125 µl de una solución de cristal violeta (CV) al 0,1% (Merck, Madrid, España). Las placas se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La solución se retiró mediante lavados con agua destilada; este procedimiento se repitió hasta que el CV no unido a la biopelícula se eliminó por completo. La placa se volvió entonces del revés hasta su completo secado; posteriormente se añadieron 125 µl de una solución de ácido acético al 30% a cada pocillo para solubilizar el CV unido a la biopelícula y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se colocaron 100 µl de la solución sobre una nueva placa de 96 pocillos que se leyó espectrofotométricamente (fotómetro de microplaca Multiskan FC, Thermo Scientific, Madrid, España) a 540 nm. Como blanco se utilizaron pocillos con 100 µl de la solución de ácido acético al 30%. Cada cepa se ensayó por triplicado.

Para clasificar las cepas en base a la producción de biomasa de la biopelícula, las cepas se dividieron en terciles, esta división proporcionó los puntos de corte para clasificar las cepas como biopelículas con baja (CV <0,44), moderada (CV entre 0,44 – 1,17) y alta (CV >1,17) biomasa.

6.2. Estudio de la actividad metabólica de las biopelículas mediante el ensayo de reducción de XTT

El ensayo de reducción de XTT se realizó según el procedimiento publicado previamente (Pierce et al., 2008). Para ello, se añadieron 100 µl de una solución de

XTT 0,5 mg/ml de menadiona 0,1 mM (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a cada pocillo que contenía las biopelículas preformadas completamente secas. Las placas se cubrieron con papel de aluminio y se incubaron a 37 °C durante 1,5 horas. Después de la incubación, se tomaron 80 µl de la solución y se colocaron en una nueva placa de 96 pocillos que se leyó espectrofotométricamente (fotómetro de microplaca Multiskan FC, Thermo Scientific, Madrid, España) a 490 nm. Como blanco se utilizaron pocillos con 100 µl de la solución XTT/menadiona. Cada cepa se ensayó por triplicado.

Las cepas se dividieron en terciles de acuerdo con la actividad metabólica presentada, esta división proporcionó los puntos de corte para clasificar las cepas como biopelículas con actividad metabólica baja (XTT <0,097), moderada (XTT entre 0,097 - 0,2) y alta (XTT >0,2).

6.3. Sensibilidad antifúngica de las biopelículas

Se utilizó un total de 100 µl de una solución de RPMI que contenía concentraciones crecientes de los antifúngicos estudiados (0,015 µg/ml a 16 µg/ml) sobre las biopelículas preformadas completamente secas (Pierce et al., 2008). Se sellaron las placas con parafilm y se incubaron a 37 °C durante 24 horas, posteriormente se eliminó el antifúngico, y se realizaron 3 lavados con 100 µl de PBS y se dejó secar; por último se añadieron 100 µl de la una solución solución de XTT 0,5 mg/ml/menadiona 0,1 mM (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Las placas se cubrieron entonces con papel de aluminio y se incubaron a 37° C durante 1,5 horas. Después de la incubación, se tomaron 80 µl de la solución y se colocaron en una nueva placa de 96 pocillos que se leyó espectrofotométricamente (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Scientific, Madrid, España) a 490 nm. Como blanco se utilizaron pocillos con 100 µl de la solución XTT/menadiona. La concentración mínima inhibitoria sésil (SCMI) se definió como una reducción del 50% (SCMI₅₀) y 80% (SCMI₈₀) de la actividad metabólica de la biopelícula tratada con antifúngico en comparación con el pocillo de control de crecimiento libre de fármaco.

6.4. Estudio de la estructura de las biopelículas mediante microscopía electrónica de barrido

Para el estudio de las biopelículas mediante microscopía electrónica de barrido, se obtuvieron discos de 50 mm retirando los fondos de las placas multipocillos. Los discos se colocaron en placas de 12 pocillos (Grenier Bio one, Alemania) y las biopelículas de *Candida* se formaron añadiendo 100 µl de suspensión de levadura en RPMI (1 x 10⁶ células/ml) a cada pocillo que contenía discos. Las placas se incubaron

durante la noche a 37° C y posteriormente los discos se lavaron suavemente 3 veces con PBS. Los biofilms preformados se fijaron después de llenar los pocillos con una solución de PBS a una concentración de 0,165 M ajustada a pH = 7 que contenía glutaraldehído al 2,5% (Fisher Scientific, Bélgica) y paraformaldehído al 4% (Thermo Scientific, Madrid, España). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, las muestras se deshidrataron mediante lavados seriados de 10 minutos de duración con soluciones que contenían 30%, 50%, 70%, 80%, 90% y 100% de etanol en agua destilada. Las muestras se secaron posteriormente con CO₂ en un secador de punto crítico (Balzers CPD 030, Schalksmühle, Alemania). Finalmente, los discos con las biopelículas se recubrieron con oro (Emitech K550X Sputter Coater, Kent, Reino Unido) y la estructura de la biopelícula se visualizó con un microscopio electrónico de barrido (JSM-6400, JEOL Ltd, Tokio, Japón).

Con el fin de estudiar el efecto antifúngico sobre las biopelículas preformadas, estas se incubaron durante 24 horas a 37 °C con 100 µL de una solución de RPMI que contenía una concentración de fármaco igual a la CMI sécil para cada caso estudiado.

7. Estudio de “fitness”

7.1. Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se determinaron siguiendo un protocolo previamente publicado (Arendrup et al., 2012b). Se ajustó un inóculo de *Candida* spp. a 1 – 5 x 10⁶ células/ml en agua estéril con un nefelómetro McFarland, y se inocularon 100 µl en una placa de 96 pocillos con 100 µl de medio RPMI 2X suplementado con 2% de glucosa y tamponado con MOPS. Se incubaron las placas con agitación a 35 °C en un espectrofotómetro óptico (fotómetro de microplaca Multiskan FC, Thermo Scientific) y se realizaron lecturas ópticas cada 15 min a 490 nm durante 36 horas. Se calculó la tasa de crecimiento, el tiempo hasta la velocidad máxima, y el crecimiento máximo (OD máximo) para cada aislado.

7.2. Modelo de infección sobre larvas de *Galleria mellonella*

Se emplearon larvas de *Galleria mellonella* en estadio larvario final (Bichosa, Salceda de Caselas, España), siguiendo los protocolos previamente descritos (Fuchs et al., 2010); las larvas se almacenaron en virutas de madera en oscuridad a 15 °C hasta el momento de la infección. Todas las larvas se utilizaron en el periodo de una

semana desde su recepción. Cada grupo experimental contenía 10 larvas con un peso similar (330 ± 20 mg). Las larvas fueron desinfectadas con etanol al 70% antes de la infección y las jeringas de Hamilton usadas para la inoculación fueron desinfectadas con tres soluciones diferentes: lejía diluida al 10%, etanol al 70%, y PBS.

Los cultivos de *Candida* spp. se cultivaron en caldo YPD (extracto de levadura, dextrosa peptona) (Difco, Becton Dickinson, Madrid, España) incubado en agitación a 160 rpm en un agitador orbital Stuart mini (BioCote, Coventry, UK) durante la noche a 30 °C. Posteriormente se realizaron dos lavados con 10 ml de PBS mediante centrifugación a 3.000 g durante 5 minutos y el inóculo se ajustó con un citómetro automático (MOXI Z Mini, Orflo Technologies) en PBS a 5×10^7 levaduras/ml para *C. albicans* y 5×10^8 levaduras/ml para *C. guilliermondii*. Las larvas fueron inoculadas con 10 μ l de la suspensión celular (5×10^5 levaduras/larva para *C. albicans* o 5×10^6 levaduras/larva para *C. guilliermondii*) directamente en la hemocele a través de la última pro-pata izquierda.



Figura 3. Infección de una larva de *G. mellonella* con una suspensión de *Candida* spp.

Se realizaron recuentos viables para confirmar los inóculos. Como control se utilizó un grupo de 10 larvas inoculadas con 10 μ l de PBS para monitorizar el trauma tras la inyección y un grupo de 10 larvas sin inyectar. La muerte de las larvas se

determinó por inspección visual diaria desde el día de la infección hasta los 7 días posteriores. Las curvas de supervivencia para cada aislado se generaron usando el método de Kaplan-Meier. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism (Versión 5.0) y la prueba Log-rank (Mantel-Cox) se aplicó para el estudio de las diferencias entre las curvas de supervivencia.

Para *C. albicans* se clasificaron provisionalmente los aislados según el porcentaje de mortalidad de las larvas al día +1 después de la infección como cepas con baja patogenicidad (porcentaje de mortalidad entre 0-30%), moderada patogenicidad (porcentaje de letalidad entre 31% - 70%) y alta patogenicidad (porcentaje de mortalidad > 70%).

7.2.1. Evaluación histológica de las larvas de *G. mellonella*

Los estudios histopatológicos en las larvas de *G. mellonella* infectadas fueron realizados para verificar la invasividad de cepas con baja, moderada y alta patogenicidad de acuerdo a la clasificación elegida. Se seleccionaron aislados con baja y moderada patogenicidad para determinar la invasividad de los tejidos larvarios tras 24 horas post infección, así como estudiar la respuesta inmune en cada una de las categorías establecidas. Se obtuvieron secciones de tejidos tras 24-48 horas desde la infección siguiendo un protocolo previamente descrito (Perdoni et al., 2014). Brevemente, se inoculó formalina tamponada al 10% en las larvas escogidas que se procesaron mediante secciones en serie cortadas transversalmente. Las secciones de tejido fueron embebidas en parafina y procesadas rutinariamente para histopatología convencional. Las secciones seriadas de tejidos de 4 micrómetros de grosor se tiñeron con hematoxilina y eosina, y tinción peryódica de ácido-Schiff (PAS). Las imágenes obtenidas (NanoZoomer-XR C12000, Hamamatsu Photonics) permitieron estudiar la presencia y tamaño de nódulos, la presencia de melanización y la invasión de levaduras en tejidos larvarios importantes.

Resultados



1. Identificación y sensibilidad a antifúngicos de levaduras causantes de fungemia

1.1. Epidemiología de las especies causantes de fungemia

Durante el período de estudio (enero de 2007 a diciembre de 2013), se registraron 612 episodios de fungemia. La distribución de las especies encontradas se muestra en la Tabla 1. Los aislados de 14 episodios no estaban disponibles (*C. albicans* [n = 7], *C. parapsilosis* [n = 5], *C. glabrata* [n = 1] y *Blastoschyzomyces capitatus* [n = 1]). Se estudiaron 613 aislados de los restantes 598 episodios diagnosticados en 544 pacientes ingresados en el momento de la toma de sangre en unidades médicas (25%), unidades de cuidados intensivos (20%), quirófanos (19%), neonatología (15%), oncología-hematología (14%) y otras áreas del hospital (7%).

Tabla 1. Distribución de las especies causantes de fungemia en los 544 pacientes estudiados tras amplificación y posterior secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2.

Especies	n	%
<i>Candida albicans</i>	282	46
<i>Candida parapsilosis</i> complex		
<i>Candida parapsilosis</i> sensu stricto	165	26,9
<i>Candida orthopsilosis</i>	4	0,6
<i>Candida metapsilosis</i>	2	0,3
<i>Candida glabrata</i>	60	9,8
<i>Candida tropicalis</i>	49	8
<i>Candida krusei</i>	10	1,6
<i>Candida</i> spp.		
<i>Candida guilliermondii</i> sensu stricto	7	1,1
<i>Pichia caribbica</i>	3	0,5
<i>Kodamaea ohmeri</i>	1	0,2
<i>Candida dubliniensis</i>	5	0,8
<i>Candida lusitaniae</i>	2	0,3
<i>Candida kefyr</i>	2	0,3
<i>Pichia anomala</i>	1	0,2
Otras levaduras no <i>Candida</i>		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	7	1,1
<i>C. neoformans</i> var <i>grubii</i>	4	0,7
<i>Trichosporon asahii</i>	2	0,3
<i>C. neoformans</i> var <i>neoformans</i>	2	0,3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,2
<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0,2
<i>Trichosporon japonicum</i>	1	0,2
<i>Trichosporon inkin</i>	1	0,2
<i>Arxula adenivorans</i>	1	0,2

C. albicans fue la principal causa de fungemia (46%), seguida por *C. parapsilosis* complex (27,8%), *C. glabrata* complex (9,8%), *C. tropicalis* (8%), *C. krusei* (1,6%), *Candida* spp. (3,4%) y otras levaduras diferentes a *Candida* (3,4%). La proporción de episodios causados por especies crípticas fue baja. No se detectó *C. nivariensis* o *C. bracariensis* en aislados pertenecientes a *C. glabrata* complex. En cuanto a *C. parapsilosis* complex, el 96,4% de los aislados fueron *C. parapsilosis* sensu stricto, el 2,4% *C. orthopsilosis* y el 1,2% *C. metapsilosis*. En el complejo *C. guilliermondii*, el 63,6% de las cepas fueron confirmadas como *C. guilliermondii* sensu stricto, 27,3% como *Pichia caribbica* y 9,1% como *Kodamaea ohmeri*. Las especies crípticas de estos 2 complejos infectaron frecuentemente a los pacientes con afectación gastrointestinal (78%) como por ejemplo, cáncer sólido, cirugía abdominal y mucositis.

La identificación convencional – basada en los medios de cultivo cromogénicos y las pruebas de identificación bioquímicas – fueron suficientes para llegar a la identificación correcta de una gran proporción de los aislados. Sin embargo, la secuenciación de la región ITS fue necesaria para asegurar la correcta identificación del 7% de los casos, por no haberse llegado a una identificación lo suficientemente fidedigna o por tratarse de infecciones polifúngicas no detectadas por el CHROMagar. De los 15 episodios de infecciones polifúngicas, el CHROMagar detectó sólo una de las dos especies en tres de los casos (Tabla 2).

Tabla 2. Casos de pacientes con fungemia causada por 2 especies diferentes infecciones polifúngicas.

Especie 1	Especie 2	No. de casos	Sistema convencional
<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	4	Ambas especies
<i>C. glabrata</i>	<i>C. metapsilosis</i>	1*	Solo <i>C. parapsilosis</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1*	Solo <i>C. glabrata</i>
<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	5*	Ambas especies
<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1	Ambas especies
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	1	Solo <i>C. parapsilosis</i>
<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	1	Ambas especies
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	1	Ambas especies

* En 3 de los 15 pacientes, la identificación convencional sólo fue capaz de detectar 1 de las 2 especies causantes de la infección. Un total de 6 aislados (*C. parapsilosis* [n = 2], *C. glabrata* [n = 2], *C. metapsilosis* [n = 1] y *C. albicans* [n = 1]) de 3 pacientes con infección polifúngica fueron excluidos de las pruebas de susceptibilidad antifúngica porque la identificación molecular reveló una mezcla de secuencias después de varios intentos de obtener aislados de cultivo puro.

Las infecciones polifúngicas pudieron detectarse gracias a la identificación molecular porque en aislados aparentemente puros pudo observarse una mezcla de secuencias que representaban una co-infección que pudo confirmarse en cultivo sólo tras incubar prolongadamente las placas cromogénicas hasta 5 días.

1.2. Susceptibilidad antifúngica

La actividad de los siete agentes antifúngicos estudiados se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Actividad antifúngica (en µg/ml) de los fármacos estudiados frente a los 606 aislados incluidos en el análisis obtenida a través del procedimiento EUCAST EDef 7.2.

Especies		AmB	FLU	VRC	POS	MYC	AND	CAS
<i>C. albicans</i>	Moda	0,5	0,125	≤0,015	≤0,015	≤0,015	≤0,015	0,062
	MIC ₅₀	0,5	0,125	≤0,015	≤0,015	≤0,015	≤0,015	0,062
	MIC ₉₀	1	0,25	≤0,015	0,031	≤0,015	≤0,015	0,125
	Rango	0,062-1	≤0,125-≥64	≤0,015-≥16	≤0,015-8	≤0,015-1	≤0,015-2	≤0,015-0,5
<i>C. parapsilosis</i>	Moda	0,25	0,25	≤0,015	0,031	1	2	0,5
	MIC ₅₀	0,25	0,25	≤0,015	0,031	1	2	0,5
	MIC ₉₀	1	0,5	≤0,015	0,062	2	2	1
	Rango	0,062-1	≤0,125-2	≤0,015-0,062	≤0,015-0,125	≤0,015-2	≤0,015-4	0,125-2
<i>C. glabrata</i>	Moda	0,25	8	0,25	0,5	≤0,015	0,031	0,125
	MIC ₅₀	0,25	8	0,25	0,5	≤0,015	0,031	0,125
	MIC ₉₀	1	≥64	1	1	≤0,015	0,031	0,125
	Rango	0,125-1	2-≥64	0,062-4	0,125-2	≤0,015-0,031	≤0,015-0,031	0,062-0,125
<i>C. tropicalis</i>	Moda	0,5	0,25	≤0,015	≤0,015	0,031	≤0,015	0,125
	MIC ₅₀	0,5	0,25	≤0,015	≤0,015	0,031	≤0,015	0,125
	MIC ₉₀	1	0,5	0,031	0,031	0,031	0,031	0,125
	Rango	0,25-1	≤0,125-1	≤0,015-0,062	≤0,015-0,062	≤0,015-0,25	≤0,015-0,125	0,031-0,125
<i>C. krusei</i>	Moda	0,5	≥64	0,5	0,25	0,062	0,062	0,125
	MIC ₅₀	0,5	≥64	0,5	0,25	0,062	0,062	0,125
	MIC ₉₀	1	≥64	0,5	0,25	1	2	0,5
	Rango	0,5-1	16-≥64	0,125-0,5	0,062-0,25	≤0,015-1	≤0,015-2	0,062-0,5
<i>Candida</i> spp.	Moda	1	0,25	≤0,015	0,031	0,5	1	0,25
	MIC ₅₀	0,5	2	0,062	0,062	0,125	0,5	0,25
	MIC ₉₀	2	16	0,5	0,5	1	2	2
	Rango	0,125-2	≤0,125-16	≤0,015-2	≤0,015-1	≤0,015-4	≤0,015-2	0,031-8
Otras levaduras no <i>Candida</i>	Moda	1	≥64	0,031	1	8	8	8
	MIC ₅₀	1	8	0,25	0,5	8	8	8
	MIC ₉₀	8	≥64	8	2	≥16	≥16	≥16
	Rango	0,5-8	0,5-≥64	0,031-8	0,031-4	0,125-≥16	0,5-≥16	0,25-≥16

Seis aislados fueron excluidos de las pruebas de sensibilidad antifúngica porque la identificación molecular reveló mezcla de secuencias después de varios intentos por obtener aislados de cultivo puro; el aislado de *S. cerevisiae* no creció en RPMI; **AmB**: anfotericina B; **FLU**: fluconazol; **VRC**: voriconazol; **POS**: posaconazol; **MYC**: micafungina; **AND**: anidulafungina; **CAS**: caspofungina. Los aislados de *C. orthopsilosis* (n = 3) y *C. metapsilosis* (n = 1) fueron considerados como *C. parapsilosis* para el análisis de la tasa de resistencia. Las CMI ≤0,015 µg/ml o ≤0,125 µg/ml se transformaron a 0,015 µg/ml y 0,125 µg/ml, respectivamente, para fines de análisis estadísticos.

Todos los aislados fueron sensibles a anfotericina B. La resistencia global fue de 5% para fluconazol, 4,4% para micafungina, y 3,8% para anidulafungina. El porcentaje de cepas de *Candida* resistentes a fluconazol fue bajo y varió entre 0,7% (*C. albicans*) y 8,6% (*C. glabrata*). Los aislados de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* fueron sensibles a fluconazol y al resto de azoles. A pesar de que los aislados de *Cryptococcus neoformans* eran uniformemente susceptibles a fluconazol, los aislados de otras levaduras diferentes a *Candida* como *Rhodotorula* spp. (100%), *Trichosporon* spp. (25%), y *Arxula adenivorans* (100%) mostraron un alto porcentaje de resistencia a este fármaco. La tasa de resistencia antifúngica para cada combinación fármaco-especie se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de resistencia a los agentes antifúngicos estudiados para las diferentes especies de *Candida* y otros géneros.

Especies	% de cepas intermedias/resistentes o No-WT					
	AmB	FLU	VRC	POS	MYC	AND
	R	I/R	R	R	I/R	I/R
<i>C. albicans</i>	0	0/0,7	0,7	0,7	0/1,4	0/0,4
<i>C. parapsilosis</i> complex ^a	0	0/0	0	0	100/0	100/0
<i>C. glabrata</i>	0	91,4/8,6	5,2	7	0/0	0/0
<i>C. tropicalis</i>	0	0/0	0	0	0/4,1	0/2
<i>C. krusei</i> ^b	0	0/100	0	0	0/10	0/10
<i>Candida</i> spp.	NA	0/19	NA	NA	NA	NA
Otras levaduras	NA	0/47,4	NA	NA	0/100	0/100
Todas las especies ^d	NA	8,7/5	NA	NA	4	28,7/3,8
Sólo especies de <i>Candida</i> ^d	0 ^c	9/3,6	0,9	1	2	29,6/0,5

NA, no aplicable. No-WT, tipo no salvaje. AmB: anfotericina B; FLU: fluconazol; VRC: voriconazol; POS: posaconazol; MYC: micafungina; AND: anidulafungina; CAS: caspofungina. ^aSe consideraron como *C. parapsilosis* los aislados de *C. metapsilosis* (n = 3) y *C. orthopsilosis* (n = 1) para el análisis de la tasa de resistencia. ^b *C. krusei* se consideró resistente al fluconazol. ^c La tasa de resistencia a anfotericina B sólo se calculó para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*. ^d Seis aislados fueron excluidos de las pruebas de sensibilidad antifúngica porque la identificación molecular reveló una mezcla de secuencias después de varios intentos de obtener aislados de cultivo puro; el aislado de *S. cerevisiae* no creció en RPMI.

Se analizó la evolución en la tasa de resistencia a fluconazol y equinocandinas a lo largo del período de estudio (Tabla 5). La tasa de resistencia a fluconazol para *Candida* osciló entre el 0% (2009) y el 6,4% (2010), aunque se mantuvo estable en torno al 4% desde 2011. La tasa de resistencia a las equinocandinas fue baja y sólo 7 cepas de *Candida* mostraron resistencia fenotípica a anidulafungina y/o micafungina (*C. albicans* [n = 4], *C. tropicalis* [n = 2] y *C. krusei* [n = 1]).

Tabla 5. Evolución de la resistencia a fluconazol y a las equinocandinas durante el período de estudio (2007-2013). La tasa de resistencia se calculó globalmente y específicamente para aislados de *Candida* spp.

Especies ^a	% resistencia antifúngica						
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Fluconazol							
<i>C. albicans</i> (n=281)	0	0	0	1,8	2,6	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (n=168)	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (n=58)	10	12,5	0	28,5	8,3	0	0
<i>C. tropicalis</i> (n=49)	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. krusei</i> (n=10)	100	0	0	100	100	100	100
<i>Candida</i> spp. (n=21)	50	20	0	16,6	0	0	25
Levaduras no <i>Candida</i> (n=19)	33,3	100	25	100	50	60	0
Sólo especies de <i>Candida</i> (n=587)	3,3	2,3	0	6,4	4,7	4,2	3,4
Todas las especies (n=606) ^a	4	3,3	1,4	8,4	5,8	7,8	3,3
Equinocandinas							
<i>C. albicans</i> (n=281)	1,7	0	0	1,8	0	6	0
<i>C. parapsilosis</i> n=168	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i> n=58	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i> n=49	0	14,2	0	0	16,6	0	0
<i>C. krusei</i> n=10	50	0	0	0	0	0	0
Otras <i>Candida</i> spp (n=21)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Levaduras no <i>Candida</i> (n=19)	100	100	100	100	100	100	100
Sólo especies de <i>Candida</i> (n=566) ^b	1,7	1,2	0	1,1	1,2	2,8	0
Todas las especies (n=585) ^{a,b}	4,1	2,3	5,5	3,4	3,6	9,2	3,5

NA = No aplicable. ^a Seis aislados se excluyeron de la prueba de sensibilidad antifúngica porque la identificación molecular mostró una mezcla de diferentes especies después de varios intentos de obtener aislados de cultivo puro; el aislado de *S. cerevisiae* no creció en RPMI. No se aislaron cepas de *C. krusei* en 2008 y 2009. ^b Los aislados de *Candida* spp. se excluyeron del análisis de la tasa de resistencia a equinocandinas debido a la falta de puntos de corte clínicos o ECOFF.

Una cepa de *C. tropicalis* presentó una CMI para micafungina de 0,25 µg/ml y mostró una mutación puntual (R647G) en la región HS1 del gen *fks1*. Los restantes 6 aislados fueron salvajes para los genes *fks* y la mayoría de ellos (n = 5/6) mostraron una CMI ligeramente mayor (1 o 2 diluciones por encima) al punto de corte o ECOFF para anidulafungina y micafungina (Tabla 7). La tasa de resistencia antifúngica a fluconazol y equinocandinas estuvo muy influenciada por el número de episodios causados por especies de *Candida* con sensibilidad disminuida al fluconazol (*C. krusei* y *C. glabrata*) o por especies de levaduras de géneros diferentes de *Candida* intrínsecamente resistentes a equinocandinas como *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp. o *Rhodotorula* spp.

Las características de los pacientes infectados con cepas de *Candida* resistentes a fluconazol (n = 19; 3,5%) o a equinocandinas (n = 7; 1,3%) se muestran en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Características de los 19 pacientes infectados con cepas de *Candida* resistentes a fluconazol.

Fecha candidemia	Especie	Condición de base	Antifúngico Previo	Resistencia	Tratamiento Antifúngico	Evolución
02/01/2007	<i>C. krusei</i>	Diabetes + litiasis	No	MYC+AND+FLU	AmB	Favorable
20/05/2007	<i>C. guilliermondii</i>	Adenocarcinoma de colon	No	FLU	Desconocido	Favorable
27/11/2007	<i>C. krusei</i>	Cáncer orofaríngeo	FLU	FLU	AmB	Éxito 7 días
21/10/2007	<i>C. glabrata</i>	Leucemia linfóide crónica	VOR	Triazoles	CAS	Favorable
10/10/2008	<i>C. guilliermondii</i>	Adenocarcinoma de colon	No	FLU	VOR	Favorable
22/12/2008	<i>C. glabrata</i>	Diabetes	FLU	FLU	CAS	Favorable
26/01/2010 ^a	<i>C. glabrata</i>	Cirugía abdominal	No	Triazoles	AND + AmB	Favorable
30/05/2010	<i>C. lusitanae</i>	Leucemia linfóide aguda	FLU, POS, ITRA	FLU	AmB + VOR	Éxito 30 días
23/08/2010	<i>C. albicans</i>	Diabetes + litiasis	VOR	Triazoles+MYC	MYC	Favorable
28/09/2010	<i>C. krusei</i>	Hepatitis	No	FLU	AmB + VOR	Éxito 30 días
27/12/2010 ^b	<i>C. krusei</i>	Adenocarcinoma pélvico	FLU	FLU	MYC	Éxito 7 días
08/03/2011	<i>C. krusei</i>	Sarcoma retroperitoneal	FLU y CAS	FLU	MYC / AND	Éxito 7 días
27/07/2011	<i>C. albicans</i>	Cirugía abdominal + Recién nacido	No	Triazoles	AmB	Favorable
08/11/2011	<i>C. glabrata</i>	Adenocarcinoma gástrico	FLU	FLU	MYC	Favorable
02/01/2012	<i>C. krusei</i>	Cáncer esofágico	FLU	FLU	MYC	Éxito 30 días
05/03/2012	<i>C. krusei</i>	Cirrosis hepática	No	FLU	CAS	Favorable
29/05/2012	<i>C. krusei</i>	Transplante renal	FLU	FLU	MYC	Favorable
05/04/2013	<i>C. krusei</i>	Leucemia linfóide aguda	POS	FLU	CAS + AmB	Favorable
23/04/2013	<i>C. guilliermondii</i>	Diabetes + pancreatitis	No	FLU	FLU + AmB + CAS	Favorable

^a Este paciente presentó un episodio adicional de candidemia causado por *C. glabrata* diagnosticado un mes después. ^b Este paciente tuvo un episodio adicional de candidemia causado por *C. krusei* diagnosticado 10 días después. AmB: anfotericina B; FLU: fluconazol; VOR: voriconazol; POS: posaconazol; MYC: micafungina; AND: anidulafungina; CAS: caspofungina.

Los pacientes tenían condiciones subyacentes graves y muchos de ellos tenían cáncer, lo que explica en parte la elevada mortalidad (74%). La mitad de los pacientes infectados con aislados resistentes a fluconazol habían recibido previamente azoles (58%). En cambio, sólo el 14% de los pacientes infectados por cepas resistentes a las equinocandinas habían recibido previamente estos fármacos.

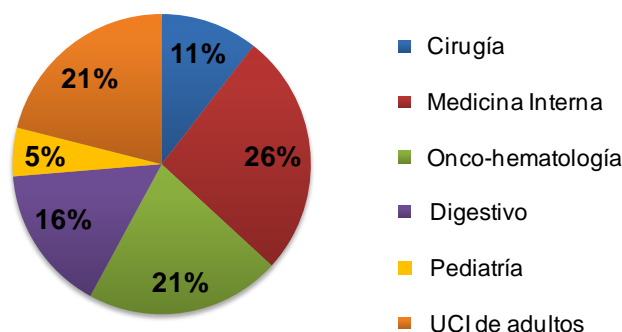
Tabla 7. Características de los 7 pacientes infectados con cepas de *Candida* resistentes a las equinocandinas.

Fecha candidemia	Especie	Condicción de base	Antifúngico previamente	Resistencia	CMI (µg/ml)		Tratamiento Antifúngico	Evolución
					AND	MYC		
01/01/2007	<i>C. albicans</i>	Cirugía cardíaca	No	MYC+AND	2	1	FLU	Éxito 30 días
02/01/2007	<i>C. krusei</i>	Diabetes + litiasis	No	MYC+AND+FLU	0,25	0,5	AmB	Favorable
02/05/2008	<i>C. tropicalis</i>	Cáncer Hipofaríngeo	FLU	MYC+AND	0,13	0,13	CAS + FLU	Éxito 30 días
23/08/2010	<i>C. albicans</i>	Diabetes + litiasis	VOR	FLU+VOR	0,02	0,03	MYC	Favorable
31/10/2011 ^a	<i>C. tropicalis</i>	Transplante renal	MYC	MYC	0,06	0,25	AmB	Éxito 7 días
19/08/2012	<i>C. albicans</i>	Linfoepitelioma	No	MYC	0,02	0,03	AND	Éxito 7 días
25/11/2012	<i>C. albicans</i>	Hemangioblastoma	AmB y azoles FLU	MYC	0,02	0,03	AmB + FLU	Favorable

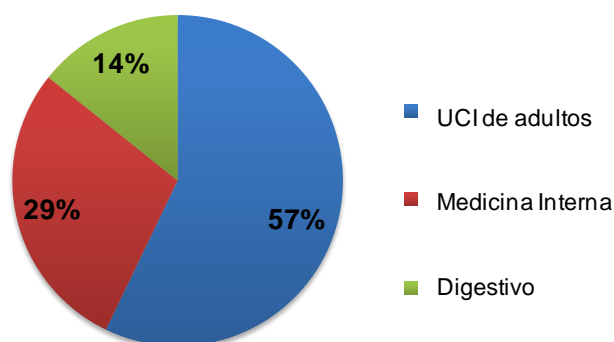
^a Paciente infectado por una cepa de *C. tropicalis* que alberga una mutación puntual (R647G) en la región HS1 del gen *fk1*. AmB: anfotericina B; FLU: fluconazol; VRC: voriconazol; POS: posaconazol; MYC: micafungina; AND: anidulafungina; CAS: caspofungina.

Las áreas de ingreso de los pacientes infectados con cepas de *Candida* spp. resistentes a fluconazol o a equinocandinas se muestran en la Figura 1.

1a



1b



*Las áreas de Medicina Interna incluyeron Geriatría, Urología, Medicina Interna, Nefrología, Enfermedades Infecciosas y Otorrinolaringología.

Figura 1. Áreas de admisión de los pacientes infectados con cepas de *Candida* spp. resistentes a fluconazol (1a) o a equinocandinas (1b).

La mayoría de los pacientes infectados con aislados resistentes a fluconazol fueron admitidos en unidades médicas, mientras que los pacientes infectados por cepas resistentes a equinocandinas principalmente se encontraban en unidades de cuidados intensivos. La tasa de resistencia a fluconazol fue de 5,4% en pacientes adultos ingresados en unidades de cuidados intensivos.

1.3. Comparación entre el procedimiento EUCAST Edef 7.2 y el E-Test para la determinación de la sensibilidad de *Candida* spp. a micafungina

En la Tabla 8 se muestra la sensibilidad de 160 aislados de *Candida* spp. a micafungina mediante el procedimiento EUCAST Edef 7.2 y el E-Test leído tras 24 y 48 horas de incubación.

Tabla 8. Actividad de micafungina frente a 160 aislados de *Candida* spp. utilizando el procedimiento EUCAST EDef 7.2 y el E-test leído tras 24 horas y 48 horas de incubación.

Especies	No.	CMI ₉₀ µg/ml (rango)		
		EUCAST Edef 7.2	E-test 24 h ^a	E-test 48 h
<i>C. albicans</i>	31	≤0,015 - ≤0,015 - 1	0,062 ≤0,015 - ≥16	0,125 ≤0,015 - ≥16
<i>C. parapsilosis</i>	27	2 0,25 - 2	1 ≤0,015 - 1	2 0,25 - ≥16
<i>C. glabrata</i>	40	≤0,015 ≤0,015 - 1	≤0,015 ≤0,015 - 0,25	0,031 ≤0,015 - 2
<i>C. tropicalis</i>	28	0,25 ≤0,015 - 2	1 ≤0,015 - 2	4 ≤0,015 - ≥16
<i>C. krusei</i>	10	1 ≤0,015 - 1	0,25 0,062 - 0,125	0,25 0,125 - 0,125
<i>Candida</i> spp. ^b	12	1 ≤0,015 - 1	1 ≤0,015 - 1	≥16 ≤0,015 - ≥16
No <i>Candida</i> spp.	12	8 0,125 - 8	≥16 ≥16 - ≥16	≥16 1 - ≥16
Global	160	2 ≤0,015 - 8	0,5 ≤0,015 - ≥16	4 ≤0,015 - ≥16

^a Para el E-test tras 24 horas de incubación: 55,5% de *C. parapsilosis*, 5% de *C. glabrata*, 16,6% de *Candida* spp., y 66,6% de otras levaduras no *Candida* no crecieron y se excluyeron del análisis. ^b Especies de *Candida* sin puntos de corte clínicos o ECOFF propuestos según el procedimiento EUCAST EDef 7.2.

El acuerdo esencial entre ambos procedimientos fue alto, siendo este menor tras 48 horas de incubación para todas las especies (Tabla 9).

Tabla 9. Acuerdo esencial. Porcentaje de cepas en las que la CMI difería de ± 1 , ± 2 y ± 3 diluciones sobre el método de referencia.

		≥ -3	-2	-1	0	1	2	≥ 3	% ± 1	% ± 2
<i>C. albicans</i>	24H	6,6	7	6,7	80	0	0	0	86,7	93,4
	48H	10	7	20	63	0	0	0	83,3	90
<i>C. parapsilosis</i> ^a	24H	0	0	0	25	17	33	25	41,6	74,9
	48H	7,4	0	3,7	22	41	26	0	66,6	92,5
<i>C. krusei</i>	24H	10	0	40	20	20	0	10	80	80
	48H	10	0	40	40	0	0	10	80	80
<i>C. tropicalis</i>	24H	5,5	0	18	50	25	0	4	92,8	92,8
	48H	11	0	36	46	3,5	3,5	0	85,6	89,1
<i>C. glabrata</i> ^a	24H	7,8	0	2,6	87	0	0	3	89,4	89,4
	48H	7,5	0	15	75	0	0	3	90	90
<i>Candida</i> spp. ^{a, b}	24H	0	0	30	40	30	0	0	100	100
	48H	8,3	8	33	25	25	0	0	83,3	91,6
No <i>Candida</i> spp. ^a	24H	25	0	0	75	0	0	0	75	75
	48H	8,3	0	0	83	0	0	8	83,4	83,4
Global	24H	4,5	2	11	63	11	3	5	85,8	90,3
	48H	8,8	2	19	54	9,4	5	2	82,5	89,3

^aPara el E-test tras 24 horas de incubación: 55,5% de *C. parapsilosis*, 5% de *C. glabrata*, 16,6% de *Candida* spp., y 66,6% de otras levaduras no *Candida* no crecieron y se excluyeron del análisis. ^b Especies de *Candida* sin puntos de corte clínicos o ECOFF propuestos según el procedimiento EUCAST.

El acuerdo categórico global fue alto, aunque se encontraron diferencias entre especies (Tabla 10).

Tabla 10. Acuerdo categórico entre los métodos según los puntos de corte clínicos y los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) establecidos por EUCAST EDef 7.2. También se muestra el porcentaje de acuerdo y el porcentaje de errores.

Especies	Etest 24 h ^a					Etest 48 h					
	S	R	%AC ^b	VME ^b	ME ^b	S	R	%AC	VME	ME	
<i>C. albicans</i>	S	80,6	12,9	87,1	0	12,9	64,5	29	71	0	29
	R	0	6,5				0	6,5			
<i>C. parapsilosis</i> ^c	S	100	0	100	0	0	96,3	3,7	96,3	0	3,7
	R	0	0				0	0			
<i>C. glabrata</i>	S	94,7	2,6	97,4	0	2,6	92,5	5	95	0	5
	R	0	2,6				0	2,5			
<i>C. krusei</i> ^d	S	90	0	90	10	0	90	0	90	10	0
	R	10	0				10	0			
<i>C. tropicalis</i> ^d	S	92,5	5	95	0	5	78,6	3,6	89,3	7,1	3,6
	R	0	2,5				7,1	10,7			
Overall	S	87,4	5,9	92,4	1,7	5,9	83,8	10,3	88,2	1,5	10,3
	R	1,7	5				1,5	4,4			

^a Para el E-test tras 24 h de incubación: 55,5% de *C. parapsilosis*, 5% de *C. glabrata*, 16,6% de *Candida* spp., y 66,6% de otras levaduras no *Candida* no crecieron y se excluyeron del análisis ^b AC, Acuerdo categórico; VME, falsa susceptibilidad, ME, falsa resistencia. ^cSegún el procedimiento EUCAST, no hay categoría "susceptible" para *C. parapsilosis*, y todas las cepas con una CMI ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ se consideran "Intermedio".

No se observó falsa sensibilidad para la mayoría de las especies estudiadas, con la excepción de *C. krusei*, especie en la cual el porcentaje de falsa sensibilidad fue de 11,1% (24 y 48 horas incubación). Sin embargo, el E-test mostró falsa resistencia en el 13% de los aislados de *C. albicans* tras 24 horas de incubación, porcentaje que aumentó hasta un 30% después de 48 horas de incubación; para *C. glabrata* el porcentaje de falsa resistencia fue de 4,8% a las 24 horas de incubación y aumentó a 8% tras 48 horas de incubación. Para las especies sin puntos de corte, el porcentaje de falsa resistencia fue de 7,7%. Para *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* no se encontró falsa resistencia.

El E-test clasificó correctamente como resistentes a las 5 cepas con mutaciones en los genes *fkx* y los 12 aislados de levaduras no *Candida* intrínsecamente resistentes a micafungina.

1.4. Alcance y frecuencia del efecto arrastre o “trailing” a fluconazol evaluado mediante EUCAST en aislados de *Candida* spp

La Tabla 11 muestra la distribución de los aislados por especie, la media geométrica de las CMI a fluconazol y el grado de efecto arrastre observado. En general, el porcentaje medio de arrastre fue del 6,8%, aunque se observaron diferencias entre especies, con *C. albicans* y *C. tropicalis* mostrando el mayor grado de efecto arrastre (9,75% y 9,29% respectivamente, $P < 0,001$) y *C. parapsilosis* mostrando el menor (3,71%).

Tabla 11. Distribución de especies, media geométrica de las CMI de fluconazol y rango, grado de arrastre en cada concentración de fluconazol y grado de arrastre medio.

Especies No.	MG (Rango)	Porcentaje de efecto arrastre										MG ± DS
		Concentración de Fluconazol (µg/mL)										
		0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64		
<i>C. albicans</i> (313)	0,15 (≤0,125 - 1)	11,53	11,25	10,67	10,33	10,23	9,97	9,51	9,8	10,19	9,75 ± 6,42	
<i>C. tropicalis</i> (53)	0,26 (≤0,125 - 1)	9,73	10,17	9,2	9,25	8,72	8,66	8,37	7,84	8,06	9,29 ± 7,39	
<i>C. glabrata</i> (65)	7,51 (2 - 32)	NR	NR	NR	NR	NR	9,61	5,51	4,83	4,7	6,06 ± 10,98	
<i>C. parapsilosis</i> (188)	0,35 (≤0,125 - 2)	5,3	4,43	4,43	4,04	3,83	3,45	3,43	3,41	2,96	3,71 ± 9,38	
Otras <i>Candida</i> spp. (20)	0,78 (≤0,125 - 4)	NR	6,04	2,63	2,58	2,43	2,53	2,67	2,65	2,23	3,36 ± 8,34	
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	NA	NA	24,58	22,38	21,41	20,67	19,38	18,51	16,53	15,75	19,90 ± 2,96	
Global (639)	0,32 (≤0,125 - 32)	11,29	9,52	7,8	7,39	7,1	6,82	6,39	6,35	6,18	6,79 ± 8,33	

NR, no se realizó, ya que no hubo aislados mostrando efecto arrastre a la mencionada concentración de fluconazol. NA, no aplicable. MG, media geométrica.

En general, el porcentaje más alto se observó a concentraciones de fluconazol de 0,25 µg/ml y 0,5 µg/ml, en concentraciones inmediatamente superiores a la CMI. Sin embargo, el efecto arrastre disminuyó a partir de la siguiente concentración doble por encima de la CMI y permaneció relativamente sin alteraciones hasta la

concentración más alta de fluconazol estudiada (64 µg/ml) (Tabla 11). Esta observación fue más evidente con los aislados de *C. tropicalis* una vez agrupados por el grado de efecto arrastre (Tabla 12).

Tabla 12. Grado de efecto arrastre en los aislados de *C. albicans* y *C. tropicalis*. Se detallan los resultados de las cepas incluidas en cada categoría.

Especies	Clasificación	No.	Porcentaje de Efecto Arrastre										MG ± DS
			Concentración de Fluconazol (µg/mL)										
			0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64		
<i>C. albicans</i>	Global	313	11,53	11,25	10,67	10,33	10,23	9,97	9,51	9,8	10,19	9,75 ± 6,42	
	Residual	32	3,74	3,8	3,01	2,32	1,94	1,65	1,33	1,43	1,6	1,75 ± 1,59	
	Poco	87	8,73	8,1	7,95	7,79	7,71	7,62	7,67	7,9	8,1	7,90 ± 1,22	
	Moderado	114	12,38	12,14	12,06	11,09	11,87	11,92	12,03	12,38	12,76	12,31 ± 1,42	
	Alto	80	18,99	19,48	19,05	18,86	18,77	18,53	18,5	18,64	18,96	20,64 ± 5,72	
<i>C. tropicalis</i>	Global	53	9,73	10,17	9,2	9,25	8,72	8,66	8,37	7,84	8,06	9,29 ± 7,39	
	Residual	10	6,02	4,07	3,09	2,76	2,82	2,63	2,23	1,65	2,29	3,06 ± 1,70	
	Poco	12	NR	7,39	7,42	7,21	6,92	9,65	7,11	6,79	6,75	7,07 ± 0,88	
	Moderado	17	12,3	12,18	11,56	11,33	11,45	11,23	11,3	11,14	10,25	11,40 ± 1,14	
	Alto	14	NR	22,6	21,52	19,27	17,76	17,9	17,49	17,57	17,17	21,43 ± 5,44	

NR, no se realizó, ya que no hubo aislados mostrando efecto arrastre a la mencionada concentración de fluconazol. MG, media geométrica.

La alta desviación estándar de la media del efecto arrastre observado revela una amplia dispersión de los datos y sugiere una alta variabilidad entre cepas (Tabla 11). Por esta razón, se clasificaron los aislados de acuerdo al efecto arrastre observado según unos puntos de corte provisionales. Estos puntos de corte se eligieron después de analizar el porcentaje de efecto arrastre para todas las cepas analizadas. Los aislados se clasificaron como efecto arrastre residual, efecto arrastre ligero, efecto arrastre moderado y efecto arrastre alto dependiendo de sus valores de crecimiento residual (0,1-5%, 6-10%, 11-15% y > 15%, respectivamente). El porcentaje de aislados en cada una de las cuatro categorías fue de 29,3%, 24,9%, 25,8% y 20%, respectivamente (Figura 2).

La clasificación reveló diferencias entre las especies encontrándose significativamente más aislados con efecto arrastre alto (26% en cepas) en *C. albicans* y *C. tropicalis* que en las especies restantes ($P < 0,001$). Un análisis de los aislados de *C. albicans* y *C. tropicalis* agrupados en cada categoría se muestra en la Tabla 12.

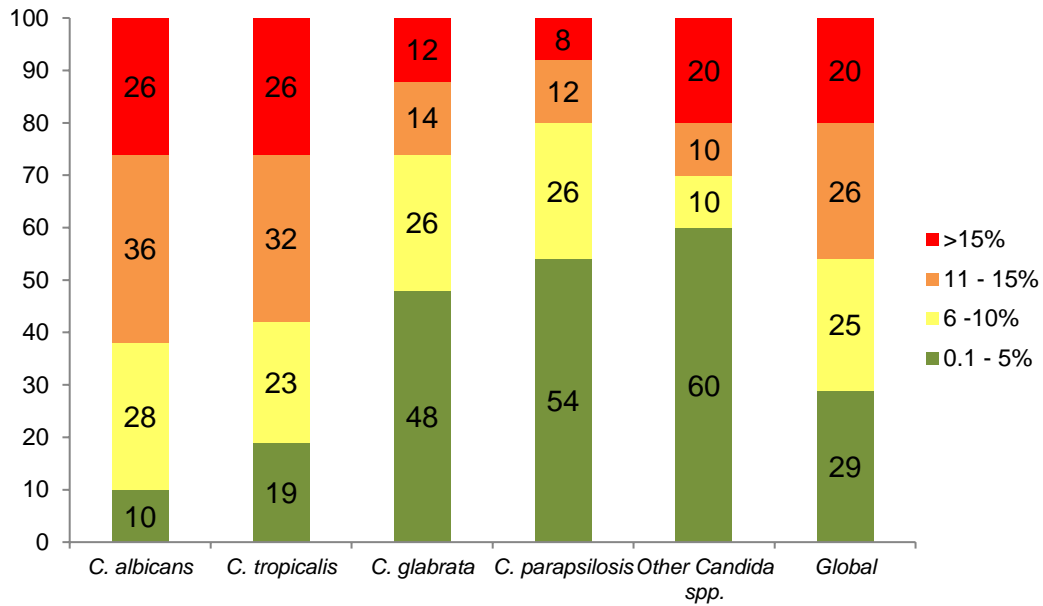
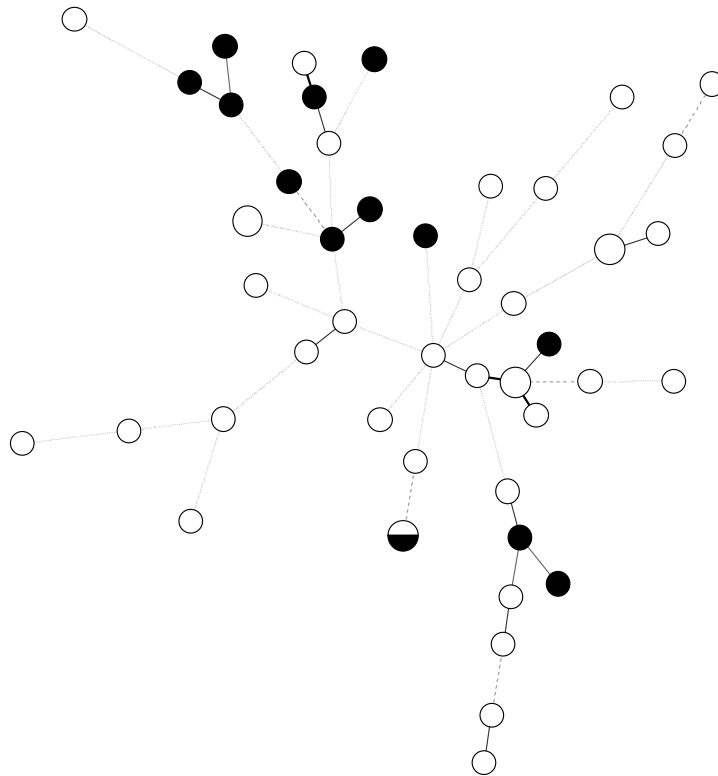


Figura 2. Porcentaje de aislados clasificados con efecto arrastre residual, ligero, moderado y alto. La figura muestra los datos globales y por especie.

Con el fin de estudiar si el efecto arrastre era un fenómeno dependiente del genotipo, se genotiparon los aislados de *C. albicans* y *C. tropicalis*, las dos especies con mayor porcentaje de cepas con efecto arrastre elevado (Figura 3).

3a)



3b)

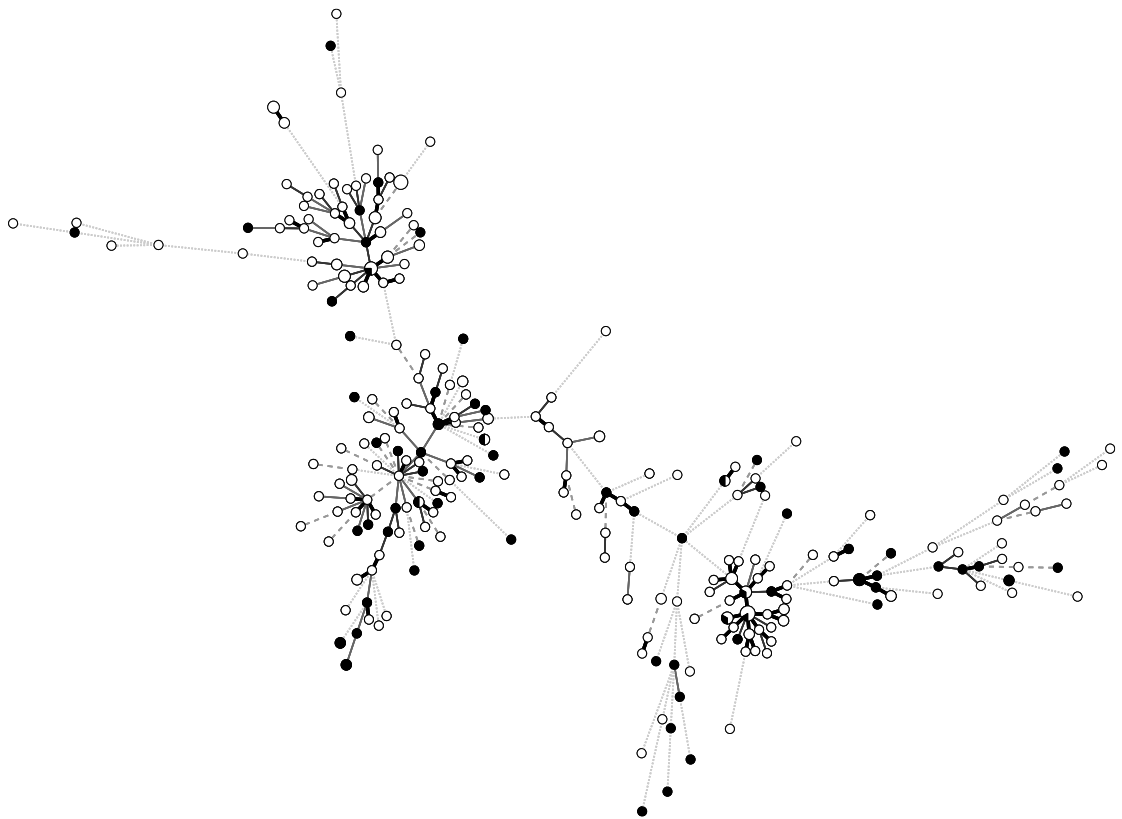


Figura 3. Mínimun spanning tree que muestra los genotipos de *C. tropicalis* (3a) y *C. albicans* (3b) como círculos. El número de aislados en cada genotipo está indicado por el tamaño de los círculos. Las líneas de conexión muestran la similitud entre los perfiles: una línea sólida en negrita indica diferencias en un solo marcador, una línea continua indica diferencias en dos marcadores, los guiones largos indican diferencias en tres marcadores y los puntos indican diferencias en cuatro o más marcadores.

En el caso de *C. albicans*, se encontraron 247 genotipos, de los cuales 24 comprendían dos o más cepas (un genotipo que incluía aislados con efecto arrastre alto, 17 genotipos que incluían aislados con efecto arrastre no-alto y seis genotipos que incluían aislados tanto con efecto arrastre alto como no-alto). En el caso de *C. tropicalis*, encontramos 46 genotipos, de los cuales tres comprendían dos o más cepas (dos genotipos que incluían aislados con efecto arrastre no-alto y un genotipo que incluía aislados con efecto arrastre tanto alto como no-alto). La presencia de genotipos idénticos en cepas con efecto arrastre diferente (tanto alto como no-alto) demuestra que el efecto arrastre no es una característica específica del genotipo.

1.5. Frecuencia del efecto paradójico observado usando el procedimiento de EUCAST con micafungina, anidulafungina y caspofungina frente a cepas de *Candida* spp. causantes de fungemia

Se observó efecto paradójico en una o más equinocandinas en el 16% (n = 96) de los aislados, y este fue más frecuente con caspofungina, seguido de anidulafungina y micafungina (Figura 4 y Tabla 13) ($P < 0,001$).

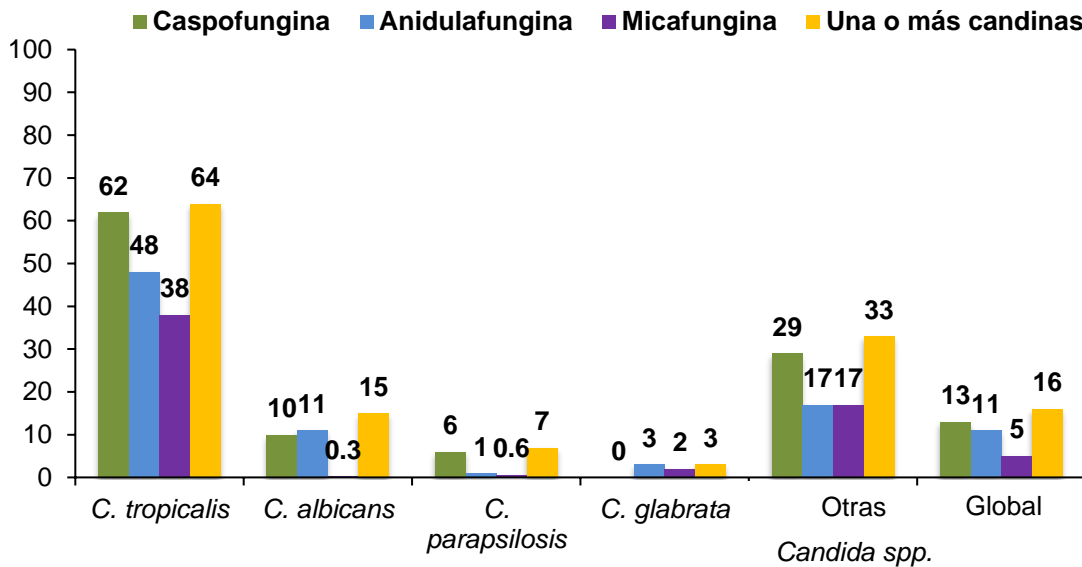


Figura 4. Porcentaje de cepas, global y por especie, en los que se observó efecto paradójico a caspofungina, anidulafungina, micafungina o cualquier combinación de las tres equinocandinas.

Tabla 13. Distribución de especies y porcentaje de aislados, global y por especie, en los que se observó el efecto paradójico a caspofungina, anidulafungina, micafungina o cualquier combinación de las tres equinocandinas en cualquier concentración del fármaco.

Concentración de Antifúngico $\mu\text{g/ml}$	Porcentaje de cepas en las que se observa el efecto paradójico																			
	Global n=602 ^a			<i>C. tropicalis</i> n=50						Otras <i>Candida</i> spp. n=24 ^b			<i>C. albicans</i> n=291			<i>C. parapsilosis</i> n=164			<i>C. glabrata</i> n=62	
	MYC	AND	CAS	MYC	AND	CAS	MYC	AND	CAS	MYC	AND	CAS	MYC	AND	CAS	MYC	AND	CAS		
0,125	0	0,3	0	0	2	0	0	0	0	0	0,3	NA	NA	NA	NA	0	0	NA		
0,25	0,2	0,7	0,2	0	4	0	0	0	4,2	0	0,7	0	NA	NA	NA	0	0	0		
0,5	2,3	1,8	1,2	18	14	6	8,3	4,2	12,5	0,3	1	0	NA	NA	NA	0	0	0		
1	3,2	2,2	1,8	26	16	8	12,5	8,3	16,7	1	1	0,3	NA	NA	NA	0	0	0		
2	3,7	4,8	5,6	30	36	32	12,5	8,3	29,2	1	3,1	1	0	NA	NA	0	0	0		
4	4	7,6	7,6	38	44	50	12,5	12,5	29,2	1,4	5,8	2,4	0	1,2	2,4	1,6	3,2	0		
8	4	8,1	11,6	38	40	54	8,3	16,7	25	0,3	8,2	2,4	0,6	0	4,3	1,6	3,2	0		
Total	4,8	10,5	13,3	38	48	62	16,7	16,7	29,2	0,3	10,7	9,6	0,6	1,2	5,5	1,6	3,2	0		

^a Las cepas de *C. krusei* (n=11) no se muestran ya que no presentaron efecto paradójico a ninguna equinocandina. ^b*C. guilliermondii* n=8, *C. dubliniensis* n=5, *C. lusitanae* n=5, *C. kefyr* n=2, *C. fermentati* n=1, *C. inconspicua* n=1, *C. pelliculosa* n=1, *Kodamaea ohmeri* n=1. MYC=Micafungina; AND=Anidulafungina; CAS=Caspofungina; NA=No aplicable. Las diferencias significativas son mostradas en negrita ($P < 0,05$).

Caspofungina presentó efecto paradójico frente a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y otras especies de *Candida* spp., mientras que anidulafungina lo presentó con más frecuencia que caspofungina y micafungina frente a *C. albicans* y *C. glabrata*. Micafungina fue el agente para el cual este efecto fue menos frecuente. Se observó que el efecto paradójico es especie-específico: *C. tropicalis* (64%) fue la especie en la que mayor proporción de cepas presentaron este efecto para una o más equinocandinas, seguida de *C. albicans* (14,8%) (Figura 4). También observamos que otras especies de *Candida* spp. presentaron una alta proporción de cepas con efecto paradójico, esto se debe principalmente a aislados de *C. dubliniensis* (4/5) y *C. guilliermondii* (4/8).

El efecto paradójico se observó a partir de concentraciones bajas $\geq 0,125$ $\mu\text{g/ml}$ de anidulafungina y $\geq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ de caspofungina y micafungina. Con el método CLSI el efecto paradójico está descrito para concentraciones de 2-64 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo el uso de la metodología de EUCAST probablemente explicaría la presencia del efecto en concentraciones más bajas. Se observó que cuanto mayor era la concentración de equinocandina, mayor fue la proporción de aislados en los que se observó tal efecto (Tabla 13). Además, el fenómeno no sólo dependía de la concentración, sino que también del fármaco, como demuestra el hecho de que caspofungina y anidulafungina causaron el efecto paradójico en un mayor porcentaje de aislados que micafungina, en la medida en que la concentración de fármaco aumentó ($P < 0,05$) (Tabla 13).

2. Caracterización genotípica y estudio de la diversidad clonal de las principales especies de *Candida* causantes de candidemia

2.1. ¿La identificación a nivel de especie proporciona evidencia suficiente para confirmar la fungemia relacionada con el catéter causada por *C. albicans*?

Se estudiaron retrospectivamente 22 pacientes ingresados en el hospital desde enero de 2008 a diciembre de 2010 con aislamiento simultáneo de *C. albicans* en hemocultivos y en el cultivo de la punta de catéter (Tabla 14).

Tabla 14. Características clínicas de los 22 pacientes estudiados y aislado de *Candida albicans* en otras muestras clínicas.

Paciente	Condición Predisponente	Neoplasia	Cirugía	NPT	Candidemia persistente	Otros comentarios
1	UCI y catéter	No	Cardíaca	Si	No	Posible endocarditis por <i>Candida. C. albicans</i> en muestra de orina
2	Catéter	No	Vascular	Des	No	<i>C. albicans</i> en muestras de orina
3	UCI y catéter	No	Cardíaca	Si	No	
4	UCI y catéter	No	Cardíaca	Des	No	<i>C. albicans</i> en muestras de LBA
5	UCI y catéter	No	Vascular	Des	No	
6	UCI y catéter	No	Abdominal	Des	No	
7	UCI y catéter	No	Abdominal	Si	No	Peso de 1590 g
8	UCI y catéter	No	No	Si	Si	<i>C. albicans</i> en muestras de orina y muestras respiratorias
9	UCIN y catéter	No	No	Des	No	<i>C. albicans</i> en muestras de orina. Peso de 2690 g
10	Catéter	LMC y neutropenia	No	Si	No	<i>C. albicans</i> en muestras de heridas superficiales
11	Catéter	No	Torácica	Des	No	<i>C. albicans</i> en muestras de orina, esputo y punto de inserción del catéter
12	UCI y catéter	No	Cardíaca	Des	Si	
13	catéter	Astrocitoma cerebral	Craneal	Des	No	
14	UCIN y catéter	No	No	Si	Si	<i>C. albicans</i> en muestras de heridas y punto de inserción del catéter. Peso 860 g
15	Catéter	No	Vascular	Des	No	
16	UCI y catéter	No	Craneal	Des	No	
17	UCIN y catéter	No	No	Si	No	<i>C. albicans</i> en muestras de exudado ótico, y piel. Peso 1130 g.
18	UCI y catéter	Cáncer de colon	Ginecológica	Des	No	<i>C. albicans</i> en muestras de líquido peritoneal
19	UCIN y catéter	No	No	Si	No	Peso 1220 g
20	UCIN y catéter	No	No	Si	No	<i>C. albicans</i> en muestras de líquido peritoneal y muestras de piel. Peso 540 g
21	UCIN y catéter	No	No	Si	No	Peso 870 g
22	Catéter	No	No	Des	No	<i>C. albicans</i> en muestras de BAS

NPT, Nutrición parenteral, UCI, Unidad de Cuidados Intensivos, UCIN, Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatología. Des. Desconocido. LBA, Lavado bronqueo alveolar, LMC, leucemia mieloide crónica, BAS, broncoaspirado.

Se encontraron coincidencias entre genotipos tanto en la punta del catéter como en la muestra de sangre en 20 de los 22 pacientes (91%) (Figura 5).

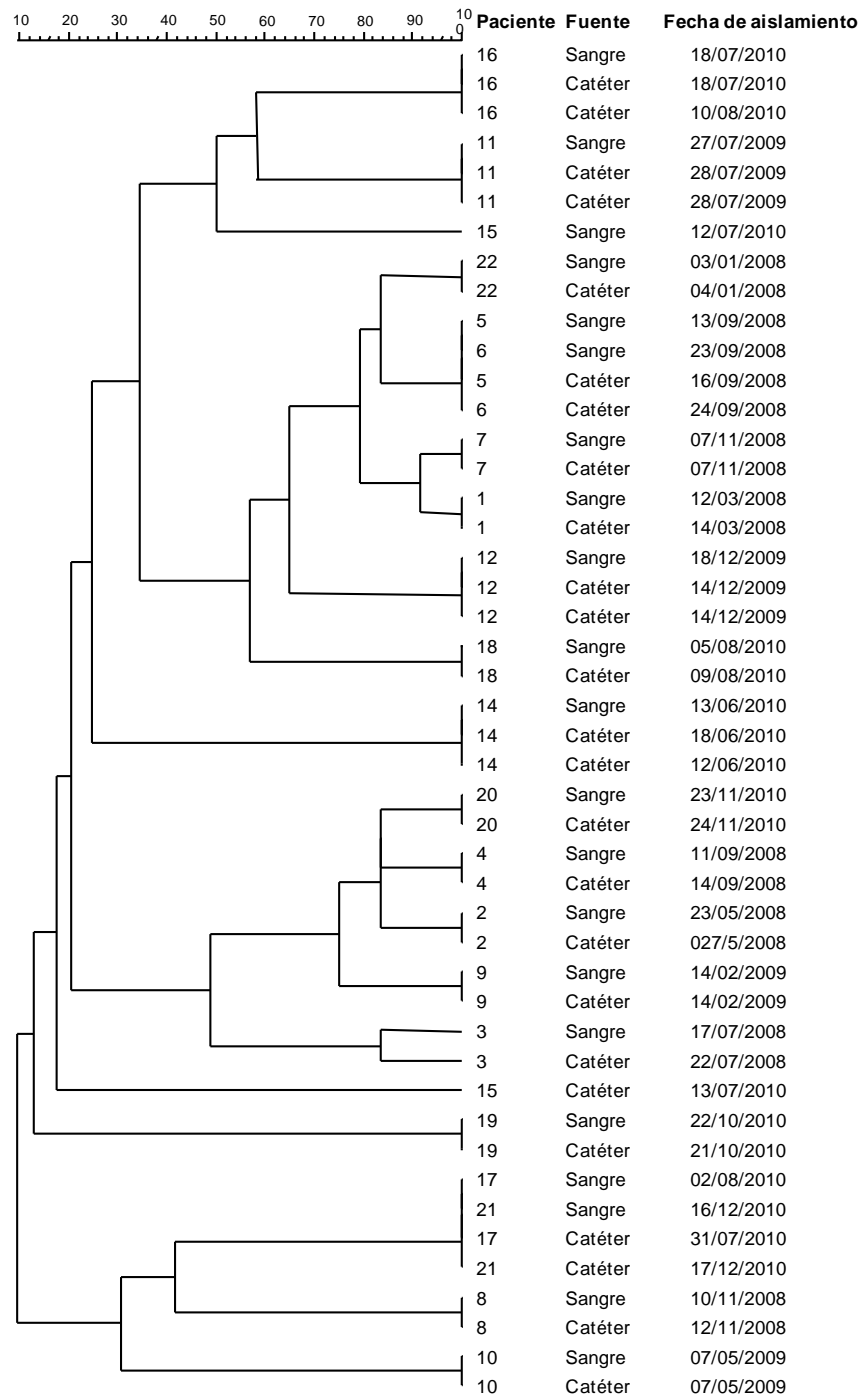


Figura 5. Dendrograma mostrando la relación genética entre los aislados estudiados. Los pacientes están numerados del 1 al 22 (el paciente número 13 tenía múltiples genotipos idénticos imposible de individualizar tanto en el catéter como en sangre por lo que no se incluyó en el dendrograma).

La edad media de los pacientes fue de 41 años; 13,6% tenían cáncer y 32% eran neonatos. En varios casos, *C. albicans* colonizó otras partes del cuerpo aunque se detectaron focos adicionales de candidemia en sólo 2 pacientes (líquido peritoneal) o sospecha de otro foco en otro paciente (posible endocarditis)

El genotipado reveló que sólo un paciente presentó más de un genotipo simultáneamente tanto en el cultivo de punta de catéter como en el hemocultivo. Este hallazgo ilustra cómo el análisis de microsatélites puede revelar la presencia de varios genotipos en una misma muestra. Los 2 pacientes restantes (pacientes no. 3 y 15; Figura 5) presentaron genotipos diferentes en ambas muestras. En el paciente no. 3, el genotipo de la punta del catéter difería del genotipo aislado de sangre en 2 marcadores (el catéter fue recibido en el laboratorio 5 días después del cultivo de sangre). En el paciente no. 15, el genotipo de la punta del catéter difería del genotipo aislado en sangre en 5 marcadores. En el caso de los pacientes en los que se analizó una segunda punta de catéter (pacientes no. 11, 12, 14 y 16) se encontraron de nuevo coincidencias entre la punta del catéter y los genotipos de sangre.

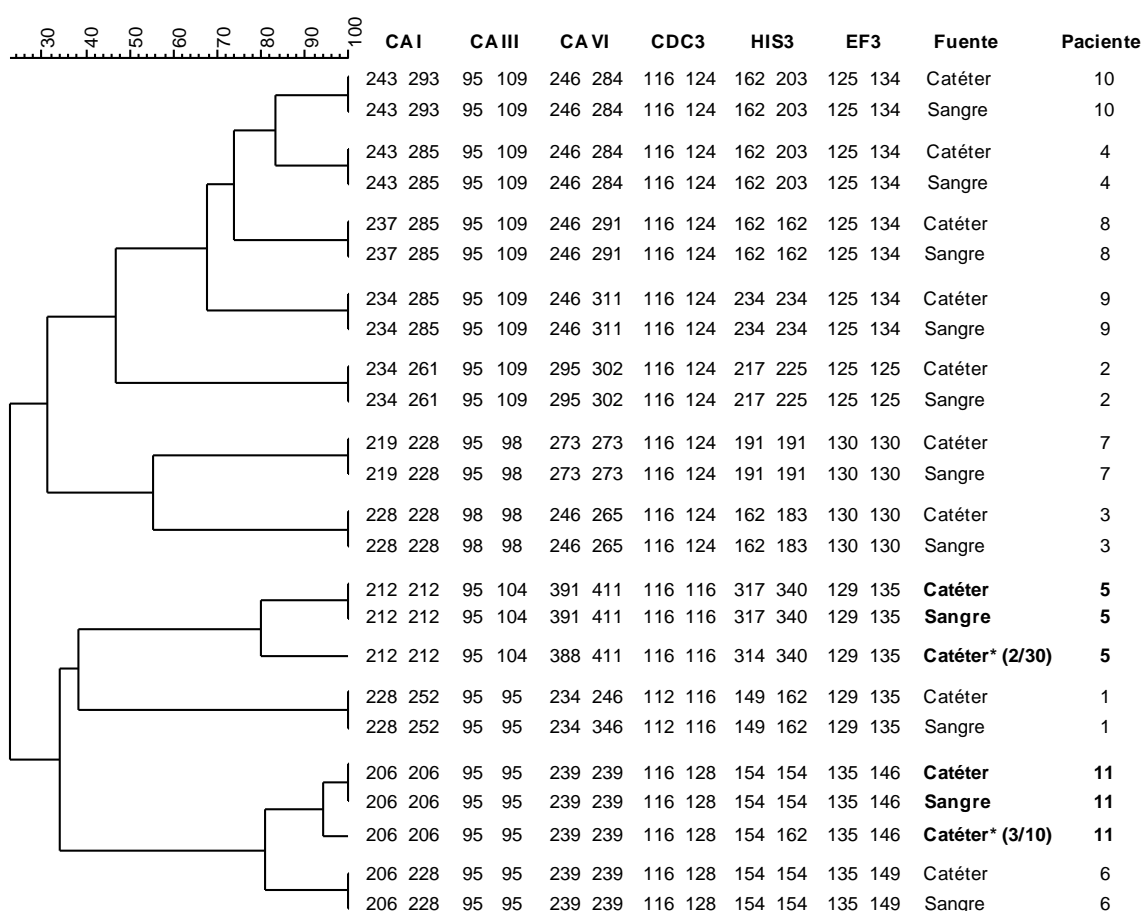
2.2. ¿Es la candidemia relacionada con el catéter una infección policlonal?

Se estudiaron 475 colonias (*C. albicans*, 110 hemocultivos y 125 catéteres; *C. parapsilosis*, 70 hemocultivos y 77 catéteres; y *C. glabrata*, 40 hemocultivos y 53 catéteres) de 20 pacientes con candidemia relacionada con el catéter. El genotipado reveló genotipos idénticos en las muestras de sangre y catéter en todos los casos (Figura 6) (Tabla 15).

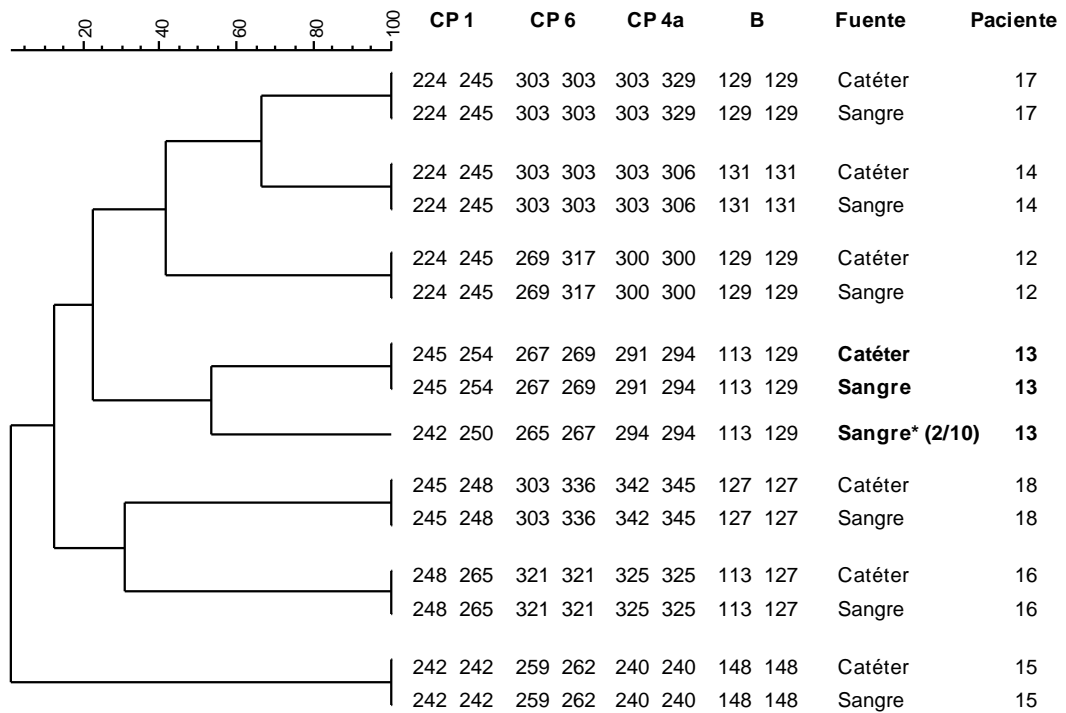
En la mayoría de los pacientes se encontró un único genotipo tanto en el catéter como en los hemocultivos (17/20). Sin embargo, en los restantes tres pacientes (pacientes no. 5, 11, y 13) se observó un patrón policlonal presentando un genotipo adicional exclusivamente en el catéter o en las muestras de sangre. En estos tres pacientes, se observaron algunos fenómenos de interés. En los pacientes no. 5 y no. 11 que tuvieron candidemia relacionada con el catéter causada por *C. albicans* se encontraron dos genotipos distintos en las colonias procedentes del catéter y sólo uno de ellos estuvo presente en el hemocultivo (Figura 6a). En las tres muestras de catéteres analizadas del paciente no. 5, se observó que el genotipo encontrado exclusivamente en el catéter estaba menos representado (2/30 colonias analizadas) y este genotipo menos representado se encontró en la luz del catéter y en la piel alrededor de la inserción pero no en el cultivo de los segmentos del catéter. En este paciente los dos genotipos encontrados diferían en dos marcadores de los seis

amplificados. En el paciente no. 11 se observó, al igual que en el caso del paciente no. 5, que el genotipo presente exclusivamente en el catéter era menos frecuente (2/10 colonias); ambos genotipos estaban clonalmente relacionados (microvariantes) y variaron en un locus. Por último, el paciente no. 13, infectado por *C. parapsilosis*, presentó dos genotipos diferentes en el hemocultivo, aunque sólo uno (8/10 colonias de sangre) se encontró en el cultivo del catéter. Los dos genotipos encontrados fueron muy diferentes ya que diferían en tres de los cuatro marcadores analizados (Figura 6b).

6a)



6b)



6c)

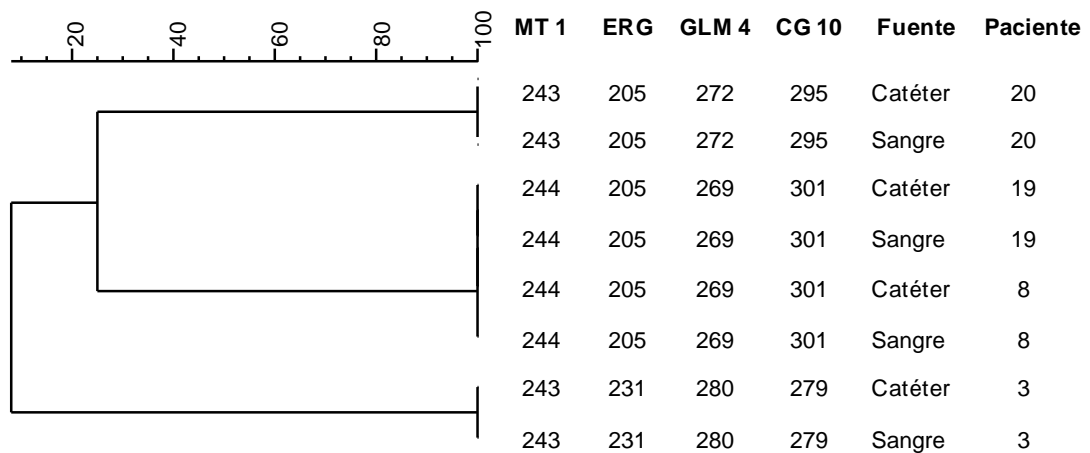


Figura 6. Dendrogramas que muestran la relación genética de los genotipos estudiados de *C. albicans* (6a), *C. parapsilosis* (6b) y *C. glabrata* (6c). Se muestran todos los marcadores para cada especie estudiada, el origen de la cepa y el número de paciente.

Tabla 15. Características clínicas de los 20 pacientes estudiados, especies aisladas en sangre y otras muestras, y características y procesamiento de las muestras de catéter.

Paciente	Especies aisladas	Sexo	Edad	Condición predisponente	Otras fuentes de Candidemia	Otras fuentes con el mismo aislamiento de <i>Candida</i> spp.	Catéter estudiado	
							Tipo y segmento	Cultivo
1	<i>C. albicans</i>	F	82	Colitis isquémica	Dehiscencia de sutura, absceso abdominal posquirúrgico	Ninguna	Catéter de subclavia derecha	Maki
2	<i>C. albicans</i>	M	78	Infarto de miocardio	No	Piel Exudado de flebitis	Catéter periférico	Maki
3	<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	F	54	Cáncer gástrico	Colección intra-abdominal	Ninguna	Hickman	Maki
4	<i>C. albicans</i>	M	0	Prematuro	No	Orina, líquido sinovial	Catéter de silicona, reservorio y punto de inserción del catéter	Maki
5	<i>C. albicans</i>	F	0	Prematuro	Enterocolitis necrotizante	Orina 4 meses previos	Catéter yugular izquierdo, reservorio e inserción superficial de la piel	Maki
6	<i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i>	M	46	Cáncer de esófago	Perforación esofágica	Líquido pleural, biopsia pleural	Port-a-Cath	Kite
7	<i>C. albicans</i>	F	0	Prematuro	No	Ninguna	Catéter silástico	Maki
8	<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	F	30	Nefropatía diabética, diálisis	Necrosis esofágica	BAL y BAS <i>C. glabrata</i>	Catéter yugular derecho	Maki
9	<i>C. albicans</i>	M	72	Hernia de hiato	Colección quirúrgica	Absceso abdominal, orina, herida quirúrgica, BAS	Catéter de subclavia izquierda	Maki
10	<i>C. albicans</i>	M	0	Prematuro	Enterocolitis necrotizante	Herida quirúrgica	Catéter de silicona	Maki
11	<i>C. albicans</i>	F	0	Prematuro	Enterocolitis necrotizante	Fluido gástrico, conjuntiva, oído	Catéter de silicona	Maki
12	<i>C. parapsilosis</i>	M	73	Enfermedad renal crónica, diálisis	Heridas isquémicas en piernas	Ninguna	Catéter shaldon 2 reservorios	Kite
13	<i>C. parapsilosis</i>	M	48	VIH	Celulitis	Ninguna	Catéter periférico	Maki
14	<i>C. parapsilosis</i>	M	47	Carcinoma rectal	Fistula intestinal	Ninguna	Catéter de subclavia y reservorio	Maki
15	<i>C. parapsilosis</i>	F	78	Linfoma	No	Ninguna	Port-a-Cath	Kite
16	<i>C. parapsilosis</i>	F	0	Prematuro	Enterocolitis necrotizante	Ninguna	Catéter de silicona	Endoluminal
17	<i>C. parapsilosis</i>	M	80	Enfermedad cardíaca isquémica	No	Ninguna	Catéter de subclavia izquierda	Maki
18	<i>C. parapsilosis</i>	F	61	Carcinoma renal	No	Ninguna	Sangre periférica DTP-Catéter subclavia	Maki
19	<i>C. glabrata</i>	F	78	Aneurisma aórtico roto	No	Ninguna	Catéter yugular y dos reservorios	Kite
20	<i>C. glabrata</i>	M	0	Prematuro	No	Ninguna	Catéter silástico	Maki

BAS, broncoaspirado, BAL, lavado bronqueo alveolar.

2.3. Genotipos de *C. albicans* y *C. parapsilosis* causantes de “clusters” de pacientes con candidemia: diferencias de frecuencia entre hospitales

Se estudiaron los parámetros de diversidad genética de cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* causantes de candidemia en pacientes ingresados en 2 hospitales con características similares situados en Madrid (Hospital Gregorio Marañón [hospital A] y Hospital Ramón y Cajal [hospital B]). Como control se incluyeron cepas de un hospital geográficamente no relacionado (Policlinico Agostino Gemelli ubicado en Roma, Italia).

Los parámetros de diversidad en la colección estudiada así como la de cada hospital se muestran en la Tabla 16. La diversidad encontrada para *C. albicans* fue como se detalla a continuación: número total de alelos 132 (media de alelos por locus=22); heterocigosidad observada y esperada, 0,64 y 0,79 respectivamente; y probabilidad de identidad, $1,3 \times 10^{-8}$. La diversidad para *C. parapsilosis* se resume a continuación: número total de alelos y 81 (media de alelos por locus=20,25); heterocigosidad observada y esperada, 0,48 y 0,83 respectivamente; y probabilidad de identidad, $2,31 \times 10^{-6}$.

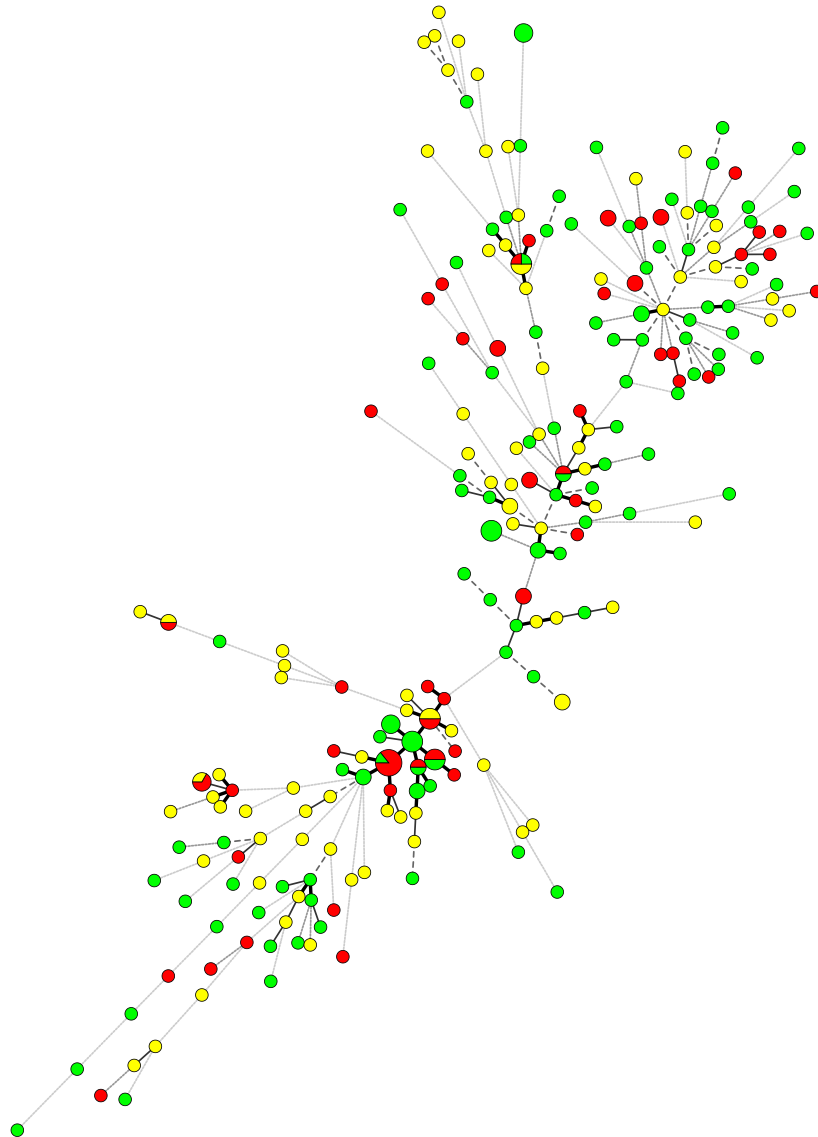
Tabla 16. Número de aislados de *C. albicans* y *C. parapsilosis* estudiados. Los parámetros de diversidad calculados son mostrados por especie y por hospital. El número medio de alelos y la heterocigosidad observada y esperada se muestran como media por locus.

	<i>C. albicans</i>			<i>C. parapsilosis</i>		
	Hosp A	Hosp B	Global	Hosp A	Hosp B	Global
Nº de cepas	116	63	179	46	30	76
Media de Nº de alelos	21,7	16	22	17,8	12	20,25
Heterocigosidad observada ^a	0,664	0,612	0,644	0,525	0,408	0,48
Heterocigosidad esperada ^a	0,804	0,768	0,797	0,842	0,768	0,825
Índice de Wright ^b	0,155	0,191	0,192	0,366	0,458	0,418
Probabilidad de Identidad ^c	$7,9 \times 10^{-9}$	$7,1 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^{-6}$
Nº de Genotipos	101	49	145	42	22	63
Nº de "clusters" (%)	9 (9%)	10 (20,4%)	21 (14,4%)	3 (7,1%)	4 (18,1%)	7 (11,1%)
Pacientes en "cluster"	24 (20,7%)	24 (38,1%)	53 (29,6%)	7 (14,9%)	12 (40%)	0 (26,3%)

^a Las heterocigosidades observadas y esperadas oscilaban entre 0 (sin heterocigosidad) y 1 (heterocigosidad más alta). ^b El índice de Wright indica una deficiencia de heterocigosidad (valores positivos) o un exceso de heterocigosidad (valores negativos). ^c La probabilidad total de identidad indica la probabilidad de encontrar dos genotipos idénticos después de seleccionar aleatoriamente dos aislados.

El número de genotipos encontrados, el número de “clusters” y el porcentaje de pacientes en “cluster” se muestran en la Tabla 16. De los 145 genotipos de *C. albicans* encontrados, 21 estaban en “cluster” (Figura 7a). Se encontraron 63 genotipos de *C. parapsilosis*, 7 de los cuales estaban en “cluster” (Figura 7b). Los “clusters” involucraron de 2 - 7 pacientes cada uno (Tablas 17 y 18).

7a



7b

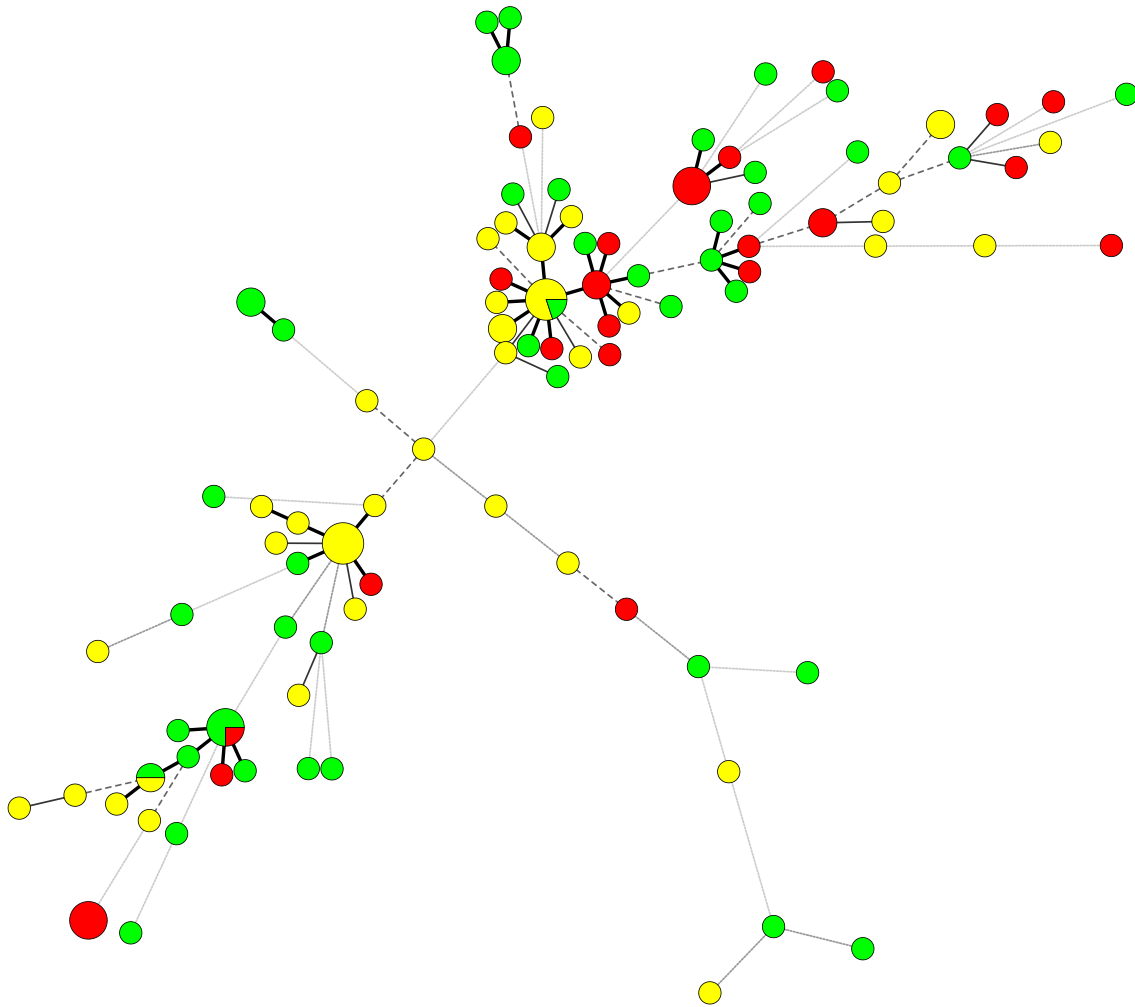


Figura 7. MST que muestra los genotipos (círculos) encontrados de *C. albicans* (Figura 7a) y *C. parapsilosis* (Figura 7b). Los círculos amarillos corresponden a los aislados del Hospital A, círculos verdes con aislados pertenecientes al Hospital B, y círculos rojos son aislados del Hospital de Roma. El número de cepas pertenecientes a cada grupo es proporcional al tamaño de los círculos. Las líneas de conexión entre círculos muestran la similitud entre los perfiles: una línea sólida en negrita indica diferencias en sólo 1 marcador, una línea continua indica diferencias en 2 marcadores, guiones largos indican diferencias en 3 marcadores y puntos indican diferencias en 4 o más marcadores.

Se encontraron 9 y 10 “clusters” de *C. albicans* en el Hospital A y el Hospital B, respectivamente; sin embargo, el porcentaje de pacientes en “cluster” fue mayor en el Hospital B (38,1%) que en el Hospital A (20,7%) ($P < 0,05$) (Tabla 16). En el caso de *C. parapsilosis*, se encontraron 3 y 4 “clusters” en el Hospital A y el Hospital B, respectivamente. De manera similar, la proporción de pacientes involucrados en “clusters” fue mayor en el Hospital B (40%) que en el Hospital A (15%) ($P < 0,05$) (Tabla 16).

Los pacientes en “cluster” infectados por *C. albicans* no se encontraban ingresados en la misma unidad, con la excepción de 3 “clusters” de pacientes ingresados en el servicio de neonatología del Hospital A (CA-34, CA-227 y CA-371) y 4 “clusters” encontrados en los servicios de Oncología, Medicina Interna, Hematología y Cuidados Intensivos del Hospital B (CA-100, CA-230, CA-290 y CA-303) (Tabla 17 y Figura 7a).

No se encontraron “clusters” de pacientes ingresados en las mismas áreas e infectados por *C. parapsilosis* en el Hospital A, mientras que en el Hospital B se encontraron 2 “clusters” de pacientes ingresados en la unidad de cuidados Intensivos (CP-31 y CP-70) (Tabla 18 y Figura 7b).

Algunos genotipos infectaron a pacientes tanto ingresados en el Hospital A como el Hospital B (*C. albicans* [genotipos CA-48, CA-59, CA-63, CA-165 y CA-310], *C. parapsilosis* [genotipo CP-117] (Tablas 17 y 18).

Hasta el 8,2% de los pacientes fueron infectados por genotipos compartidos entre los Hospitales A y B. También se estudió la presencia de “clusters” entre pacientes ingresados en el Hospital A, Hospital B y el Hospital Policlinico Universitario Agostino Gemelli en Roma. Se encontraron genotipos compartidos entre el Hospital de Roma y el hospital A (CP23 y CP-111), el Hospital de Roma y el Hospital B (CA-71, CA-100, CA-159) o compartido entre los 3 centros (CA-165).

Tabla 17. “Clusters” de *C. albicans* encontrados en los Hospitales A y B. El código de genotipo, la composición alélica, el número de pacientes involucrados, las salas de admisión de los pacientes en el momento del diagnóstico y la fecha de toma de muestra del hemocultivo se muestran para cada “cluster”.

Código de Genotipo	Composición alélica (pb)						Nº de pacientes por cluster	Unidad de admisión	Hospital	Fecha de toma de muestra
	CDC3	EF3	HIS3	CAI	CAIII	CAVI				
CA-34	120-124	143-148	149-191	203-216	92-92	234-273	3	Neonatología	A	08/02/2010 12/10/2010 16/12/2010
CA-50	116-128	146-146	154-154	206-228	95-95	239-239	3	Angiología Neonatología	A	17/07/2010 23/11/2010 16/12/2010
CA-51	116-128	135-146	154-154	206-228	95-95	239-239	4	Pediatría Oncología Geriatría Cirugía general	A	30/04/2010 7/15/2010 18/12/2010 23/08/2011
CA-56	116-116	135-146	154-154	206-206	95-95	239-239	2	Reanimación Neonatología	A	03/01/2010 01/06/2012
CA-64	116-128	135-149	154-154	206-228	95-95	239-239	2	Enfermedades infecciosas Oncología	A	13/07/2010 01/02/2012
CA-227	116-116	125-134	162-162	234-293	95-109	246-246	2	Neonatología	A	03/02/2010 15/04/2010
CA-343	116-124	130-130	162-195	216-228	95-98	246-276	3	Angiología Medicina Interna	A	07/07/2010 20/04/2011
CA-371	116-124	130-130	166-195	216-228	95-98	251-276	4	Neonatología	A	21/09/2010 24/09/2010 10/05/2010 24/10/2010
CA-4	124-124	130-138	199-221	228-231	104-104	280-299	2	Hematología UCI	B	04/06/2011 06/09/2011
CA-71	116-128	135-146	154-154	228-228	95-95	239-239	2	Urología UCI	B	03/09/2011 15/09/2010
CA-303	116-124	130-130	162-187	216-231	95-98	246-269	2	UCI	B	01/07/2011 28/12/2011
CA-290	116-124	125-134	162-221	304-307	95-115	246-246	2	Hematología	B	09/03/2012 09/05/2012
CA-230	116-124	125-134	162-162	234-298	95-95	246-246	2	Medicina Interna	B	09/12/2012 09/10/2012
CA-223	116-124	134-134	162-203	249-287	109-109	246-284	2	Cirugía general Oncología	B	07/09/2012 15/07/2012
CA-366	116-124	130-130	183-195	216-228	95-98	265-276	2	Urología UCI	B	26/12/2011 23/11/2010
CA-100	116-124	128-143	154-154	185-185	92-95	239-262	2	Oncología	B	11/10/2010 11/11/2010
CA-59	116-116	135-146	154-154	206-228	95-95	239-239	4	Urología Neurología Pediatría UCI	A B	02/02/2010 29/11/2012 03/07/2012 21/11/2012
CA-310	116-124	130-130	162-187	228-228	95-98	246-269	2	Cirugía general Oncología	A B	25/02/2010 11/10/2010
CA-63	116-128	135-135	154-154	206-228	95-95	239-239	2	UCI	A B	25/01/2011 09/09/2010
CA-165	112-116	129-135	149-162	231-255	92-95	234-246	2	Medicina Interna UCI	A B	05/12/2010 06/08/2010
CA-48	116-128	135-146	154-154	206-206	95-95	239-239	7	Neonatología Medicina Interna Digestivo Urología Cirugía general	A B	08/05/2012 09/03/2012 09/10/2012 31/05/2012 06/05/2012 11/09/2010 29/11/2010

Tabla 18. “Clusters” de *C. parapsilosis* encontrados en los Hospitales A y B. El código genotipo, la composición alélica, el número de pacientes involucrados, las salas de admisión de los pacientes en el momento del diagnóstico y la fecha de toma de muestra del hemocultivo se muestran para cada “cluster”.

Clusters de <i>C. parapsilosis</i>								
Código de Genotipo	Composición alélica (pb)				Nº de pacientes	Área de Admisión	Hospital	Fecha de toma de muestra
	CP1	CP4a	CP6	B				
CP-145	242-242	256-256	254-267	145-145	2	Urgencias Oncología	A	05/07/2010 21/08/2010
CP-63	245-245	291-24	267-269	113-129	2	Neonatología Oncología	A	30/08/2010 08/06/2011
CP-31	224-245	300-300	317-317	129-129	2	UCI	B	12/12/2011 24/11/2011
CP-70	245-245	303-303	286-286	127-129	2	UCI	B	31/07/2011 08/01/2011
CP-87	245-245	325-342	317-317	127-127	4	Oncología Otorrinolaringología UCI	B	19/07/2011 17/07/2011 14/07/2011 28/09/2011
CP-138	208-242	240-240	312-321	133-133	4	UCI Medicina Interna Enfermedades infecciosas	B	24/02/2010 07/08/2011 03/02/2011 21/12/2011
CP-117	239-245	240-240	265-265	133-133	4	Angiología Cirugía general UCI	A A B	19/10/2010 30/04/2011 30/11/2011 09/12/2010

3. Estudio de la formación de biopelículas por parte de aislados de *Candida* spp. causantes de fungemia y determinación de su sensibilidad a antifúngicos

3.1. Producción de biopelículas por aislados de *Candida* y otros géneros causantes de fungemia: comparación de la producción de biomasa y actividad metabólica y desarrollo de puntos de corte

Se estudió la producción de biomasa y la actividad metabólica de las biopelículas para cada especie, medida por los procedimientos de tinción de CV y XTT. Se observó una variabilidad notable en cuanto a la producción de biopelículas y su actividad metabólica y en la cantidad de biomasa formada tanto entre especies como entre cepas de la misma especie, alcanzando incluso significación estadística, indicando así la existencia de un patrón específico de especie. *C. tropicalis* presentó la mayor producción de biomasa y *C. glabrata* fue la especie que formó biopelículas con la mayor actividad metabólica (Tabla 19).

Tabla 19. Producción de biopelícula para cada especie estudiada por la reducción de XTT y tinción de CV (expresados como media geométrica \pm SD y rango).

Especies	n	CV (MG \pm DS) / Rango	CV (MG \pm DS) / Rango
<i>C. albicans</i>	267	0,168 \pm 0,098 / 0,004 – 0,561	1,108 \pm 0,614 / 0,027 – 2,656
<i>C. parapsilosis</i>	162	0,155 \pm 0,171 / 0,004 – 0,576	0,701 \pm 0,558 / 0,014 – 2,652
<i>C. glabrata</i>	60	0,257 \pm 0,103 / 0,055 – 0,512	0,277 \pm 0,245 / 0,019 – 1,083
<i>C. tropicalis</i>	46	0,132 \pm 0,058 / 0,040 – 0,335	1,602 \pm 0,597 / 0,060 – 2,663
<i>C. krusei</i>	10	0,136 \pm 0,081 / 0,020 – 0,296	0,204 \pm 0,125 / 0,009 – 0,378
<i>Candida</i> spp ^a	19	0,148 \pm 0,092 / 0,034 – 0,414	0,397 \pm 0,360 / 0,043 – 1,257
Otras levaduras ^b	13	0,035 \pm 0,065 / 0,002 – 0,217	0,247 \pm 0,324 / 0,023 – 1,128
Global	577	0,167 \pm 0,125 / 0,002 – 0,576	0,888 \pm 0,662 / 0,009 – 2,663

CV = cristal violeta. XTT = sal de tetrazolio reducida a colorante de formazano. MG = media geométrica. SD = desviación estándar. ^a *Candida* spp. incluye *C. guilliermondii* (n = 9), *C. dubliniensis* (n = 5); *C. kefyr* (n = 2); *C. lusitanae* (n = 2), y *Pichia anomala* (n = 1). ^b Otras levaduras incluyen *Rhodotorula mucilaginosa* (n = 5), *Cryptococcus neoformans* (n = 4), *Trichosporon* spp. (n = 3), y *Saccharomyces cerevisiae* (n = 1).

La distribución de los aislados basada en los resultados de XTT y CV se dividió en terciles para establecer puntos de corte de la siguiente manera: reducción de XTT (baja actividad metabólica <0,097; actividad metabólica moderada = 0,097 - 0,2; alta actividad metabólica > 0,2) y tinción CV (baja biomasa <0,44; moderada biomasa = 0,44 - 1,17; elevada biomasa > 1,17). Se calcularon los porcentajes de cepas incluidos en cada uno de estos puntos de corte para ambos procedimientos (Figura 9).

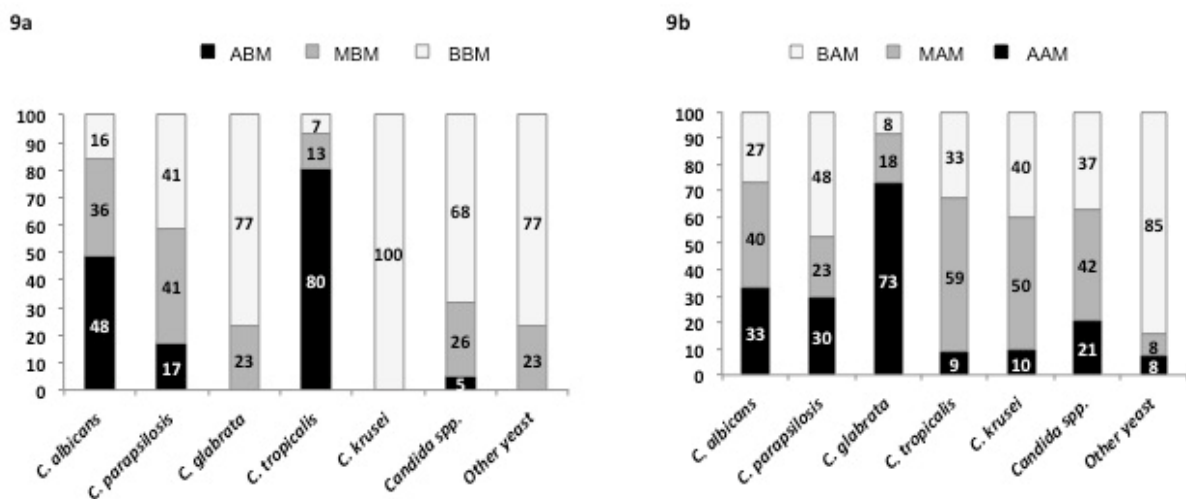
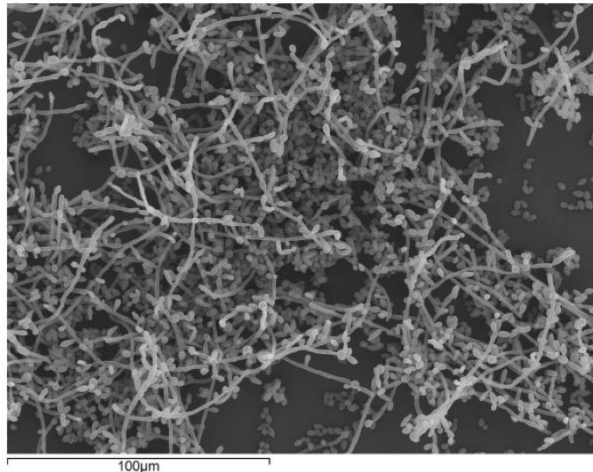


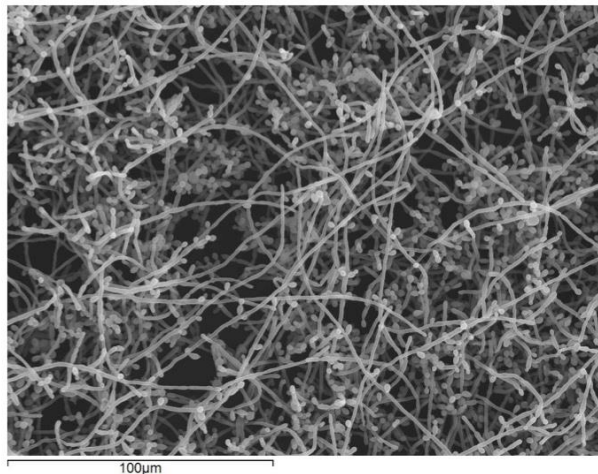
Figura 9. Porcentaje de aislados de cada especie clasificados de acuerdo a la producción de biomasa medida por tinción de CV (9a) y actividad metabólica medida por reducción del XTT (9b).

Los puntos de corte propuestos fueron validados mediante microscopía electrónica de barrido, observándose diferencias estructurales en las biopelículas de cepas con diferentes grados de biomasa. (Figura 10)

10a)



10b)



10c)

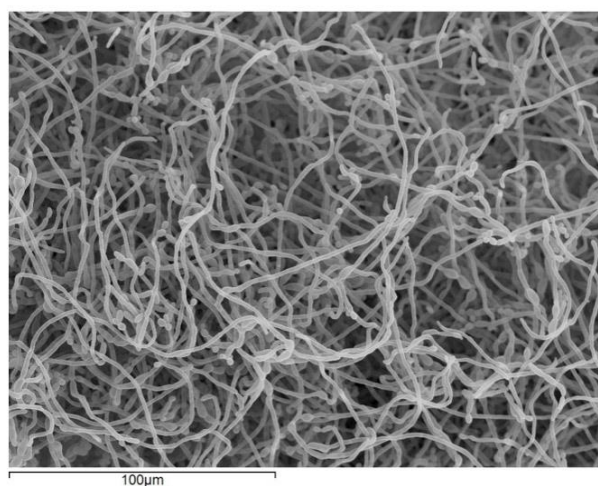
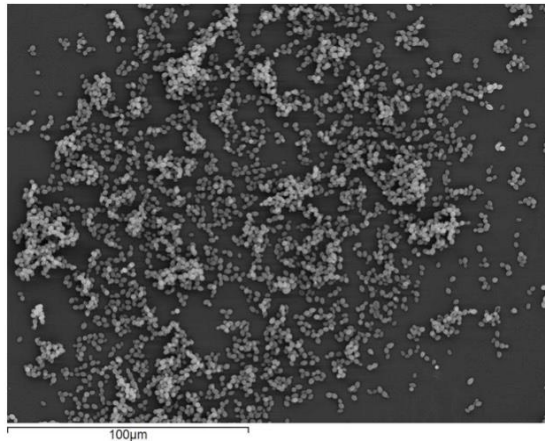


Figura 10. Características estructurales de biopelículas formadas por *C. albicans* [baja biomasa (10a), moderada biomasa (10b) y elevada biomasa (10c)] obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido. Aumento 500X.

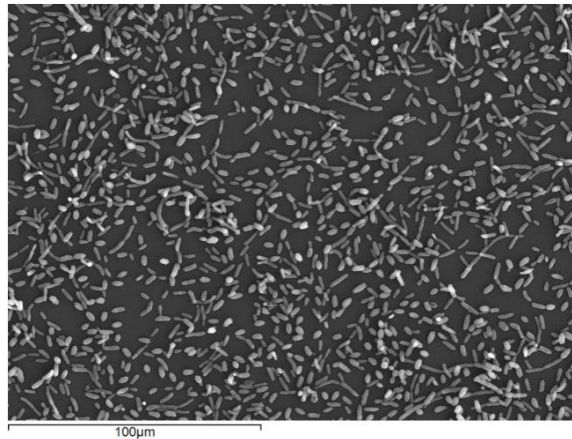
En el caso de *C. albicans*, los aislados con biopelículas con baja biomasa produjeron estructuras con menos filamentación, espacios entre agrupados celulares y un elevado número de blastosporas (Figura 10a); en cambio, los aislados con moderada y alta biomasa formaron biopelículas con una estructura gruesa y densa de hifas y menor número de blastosporas (Figuras 10b y 10c).

Las biopelículas de *Candida* spp diferentes de *C. albicans* se muestran en la Figura 11. *C. glabrata* mostró estructuras formadas por células agrupadas sin filamentación (Figura 11a). *C. parapsilosis* produjo biopelículas uniformes con abundantes blastosporas y algunas pseudohifas (Figura 11b). La estructura de las biopelículas de *C. tropicalis* era compatible con las formadas por cepas de *C. albicans* con elevada biomasa (Figuras 10c y 11c). Por último, las biopelículas de *C. krusei* estaban compuestas por células agrupadas y blastosporas sueltas sin pseudohifas (Figura 11d).

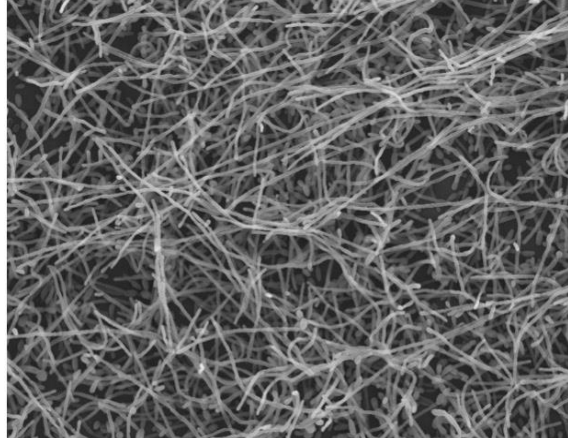
11a)



11b)



11c)



11d)

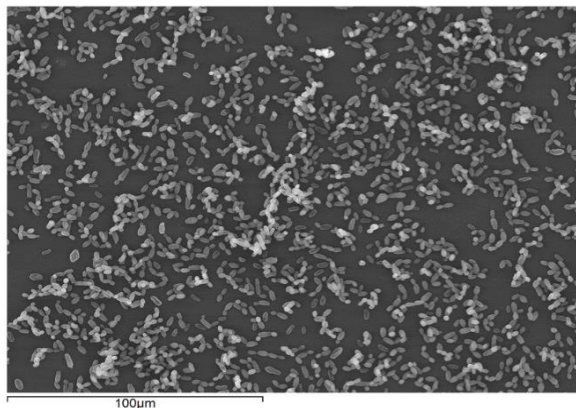


Figura 11. Estructura de biopelículas de *Candida* no-*albicans* obtenida por microscopía electrónica de barrido. *C. glabrata* (11a), *C. parapsilosis* (11b), *C. tropicalis* (11c) y *C. krusei* (11d). Aumento 500X.

La mayoría de los aislados de *C. tropicalis* presentaron elevada o moderada biomasa (80% y 13%, respectivamente). Un alto porcentaje de aislados de *C. albicans* presentaron también elevada (48%) o moderada biomasa (36%), y muchos aislados de *C. parapsilosis* presentaron moderada biomasa (41%). Por el contrario, las bioepelículas de todos los aislados de *C. krusei*, una alta proporción de aislados de *C. glabrata* (77%), otras especies de *Candida* spp (68%), y levaduras de otros géneros (77%) presentaron baja biomasa. También se observó un patrón específico de especie para la actividad metabólica de las biopelículas: los aislados de *C. glabrata* presentaron en su mayoría elevada (73%) o moderada (18%) actividad metabólica, seguidas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Curiosamente, más del 30% de los aislados de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, otras especies de *Candida* spp. y otros géneros presentaron baja actividad metabólica.

Se comparó el acuerdo categórico entre los procedimientos (Tabla 20).

Tabla 20. Porcentaje de acuerdo categórico total y parcial entre los procedimientos de reducción de XTT y tinción con CV.

Especies	Actividad Metabólica XTT	Biomasa CV (%)			Acuerdo	
		Baja	Moderada	Elevada	Total	Parcial
<i>C. albicans</i>	Baja	12	9	6	51,5	81,2
	Moderada	2,3	17,3	20,3		
	Elevada	1,5	9,4	22,2		
<i>C. parapsilosis</i>	Baja	30,2	11,7	5,6	50,6	71,6
	Moderada	5,6	13	4,3		
	Elevada	5,6	16,7	7,4		
<i>C. glabrata</i>	Baja	8,3	0	0	8,3	31,7
	Moderada	18,3	0	0		
	Elevada	50	23,3	0		
<i>C. tropicalis</i>	Baja	2,2	6,5	23,9	17,4	65,2
	Moderada	4,3	6,5	47,8		
	Elevada	0	0	8,7		
<i>C. krusei</i>	Baja	40	0	0	40	40
	Moderada	50	0	0		
	Elevada	10	0	0		
Otras <i>Candida</i> spp.	Baja	21,1	10,5	5,3	26,3	36,8
	Moderada	36,8	5,3	0		
	Elevada	10,5	10,5	0		
Levaduras no- <i>Candida</i>	Baja	76	7,7	0	84,6	92
	Moderada	0	7,7	0		
	Elevada	0	7,7	0		
Global	Baja	18,2	8,5	6,4	43,7	70
	Moderada	6,9	12,5	14,4		
	Elevada	8,1	12	13		

El acuerdo categórico completo se definió como el porcentaje de aislados que estaban en la misma categoría con ambos métodos. El acuerdo parcial se calculó considerando moderada/elevada biomasa o moderada/elevada actividad metabólica en la misma categoría.

Los aislados restantes se consideraron en desacuerdo (100% - acuerdo parcial). El acuerdo categórico total y parcial entre los procedimientos fue de 43,7% y 70%, respectivamente. El mayor grado de acuerdo se encontró para *C. albicans* y *C. parapsilosis* (> 50%), seguido de *C. krusei*. Por el contrario, el acuerdo fue muy bajo para *C. tropicalis* y *C. glabrata* (<20%). Los mayores porcentajes de desacuerdo entre los procedimientos, que van del 60% al 68%, se observaron para *C. krusei*, *C. glabrata* y otras especies de *Candida* spp. El desacuerdo observado para *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* se debió principalmente a aislados clasificados como moderada/alta biomasa – baja actividad metabólica, mientras que los desacuerdos para *C. glabrata*, *C. krusei* y otras *Candida* spp. fueron principalmente para aislados clasificados como baja biomasa – moderada/alta actividad metabólica.

3.2. Micafungina es más activa frente a biopelículas de *C. albicans* con elevada actividad metabólica

Se estudió la actividad de micafungina frente a 265 cepas de *C. albicans* aisladas de muestras de sangre de pacientes con candidemia. Los aislados se clasificaron de acuerdo con la actividad metabólica de las biopelículas preformadas (baja actividad metabólica [n = 70], moderada actividad metabólica [n = 105], y elevada actividad metabólica [n = 90]). La actividad de micafungina frente a las cepas en forma planctónica y sésil se muestra en las Tablas 21 y 22. Micafungina fue muy activa frente a la mayoría de los aislados en forma planctónica, sólo el 1,5% de los aislados fueron resistentes, y fue más activa frente a las células planctónicas que frente a las biopelículas (Tablas 21 y 22).

Tabla 21. Actividad antifúngica de micafungina frente a cepas de *C. albicans* con diferentes grados de actividad metabólica en estado planctónico.

Actividad metabólica XTT	No.	CMI ₅₀ (µg/ml)	No. de cepas en cada CMI											
			≤0,015	0,03	0,06	0,13	0,3	1	1	2	4	8	≥16	
Baja	70	≤0,015	<u>69</u>	<u>1</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR
Moderada	105	≤0,015	<u>103</u>	<u>1</u>	0	0	0	0	<u>1</u>	0	0	0	NR	
Elevada	90	≤0,015	<u>89</u>	<u>1</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	NR	
Global	265	≤0,015	<u>261</u>	<u>3</u>	0	0	0	0	<u>1</u>	0	0	0	NR	

NR, no realizado.

Tabla 22. Actividad antifúngica de micafungina frente a biopelículas de *C. albicans* con diferentes grados de actividad metabólica. La CMI se definió como una reducción del 50% (SCMI₅₀) y del 80% (SCMI₈₀) de la actividad metabólica de la biopelícula tratada con micafungina en comparación con el pocillo control.

Actividad Metabólica XTT	No.	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	No. de cepas en cada CMI										
				≤0,015	0,03	0,06	0,13	0,3	1	1	2	4	8	≥16
Biopelículas (SCMI₅₀)														
Baja	70	≤0,015	≥16	<u>36</u>	<u>6</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	0	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>10</u>
Moderada	105	≤0,015	2	<u>80</u>	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	0	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>7</u>
Elevada	90	≤0,015	0,5	<u>78</u>	<u>1</u>	0	0	0	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
Global	265	≤0,015	8	<u>194</u>	<u>12</u>	<u>4</u>	<u>4</u>	<u>4</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>8</u>	<u>2</u>	<u>8</u>	<u>20</u>
Biopelículas (SCMI₈₀)														
Baja	70	≥16	≥16	<u>9</u>	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	<u>6</u>	<u>43</u>
Moderada	105	8	≥16	<u>22</u>	<u>5</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	<u>6</u>	<u>1</u>	<u>17</u>	<u>49</u>
Elevada	90	2	≥16	<u>26</u>	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>33</u>
Global	265	≥16	≥16	<u>57</u>	<u>15</u>	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>7</u>	<u>13</u>	<u>6</u>	<u>26</u>	<u>125</u>

Se observó que micafungina no era consistentemente activa frente a todas las biopelículas de *C. albicans*; los aislados con baja actividad metabólica mostraron

significativamente menor sensibilidad a micafungina, seguido por los aislados con moderada y elevada actividad metabólica, independientemente de la CMI sénil analizada (SCMI₅₀ [$P < 0,001$] o SCMI₈₀ [$P = 0,001$]) (Tabla 22).

3.3. La sensibilidad de las biopelículas de *C. albicans* a caspofungina y anidulafungina no se ve afectada por su actividad metabólica o biomasa.

Se estudió la actividad antifúngica de caspofungina, anidulafungina y micafungina frente a 301 aislados de *C. albicans* (Tabla 23). Los tres fármacos presentaron una elevada actividad frente a los aislados en estado planctónico, aunque micafungina y anidulafungina fueron más activas que caspofungina ($P < 0,001$).

Tabla 23. Actividad antifúngica de caspofungina, anidulafungina y micafungina frente a los aislados planctónicos de *Candida albicans* según el procedimiento del EUCAST EDef. 7.2.

Clasificación Biopelícula	n	Caspofungina (µg/ml)			Anidulafungina (µg/ml)			Micafungina (µg/ml)		
		MG	CMI ₅₀	CMI ₉₀	MG	CMI ₅₀	CMI ₉₀	MG	CMI ₅₀	CMI ₉₀
BAM	73	0,06	0,06	0,125	0,02	≤0,015	≤0,015	0,02	≤0,015	≤0,015
MAM	127	0,07	0,06	0,125	0,02	≤0,015	≤0,015	0,02	≤0,015	≤0,015
AAM	101	0,07	0,06	0,125	0,02	≤0,015	≤0,015	0,02	≤0,015	≤0,015
BBM	41	0,07	0,06	0,125	0,02	≤0,015	≤0,015	0,02	≤0,015	≤0,015
MBM	116	0,07	0,06	0,125	0,02	≤0,015	≤0,015	0,02	≤0,015	≤0,015
ABM	144	0,06	0,06	0,125	0,02	≤0,015	≤0,015	0,02	≤0,015	≤0,015
Global	301	0,07	0,06	0,125	0,02	≤0,015	≤0,015	0,02	≤0,015	≤0,015

BAM, baja actividad metabólica; MAM, moderada actividad metabólica, AAM, alta actividad metabólica; BBM, baja biomasa; MBM, moderada biomasa; ABM, alta biomasa.

Las tres equinocandinas fueron uniformemente activas frente los aislados en forma planctónica, independientemente de la actividad metabólica o de la producción de biomasa de su respectiva forma sénil. Los tres fármacos fueron activos frente a las biopelículas preformadas de *C. albicans* (Tabla 23). Micafungina fue el fármaco más activo, independientemente del estudio de la SCMI₅₀ o SCMI₈₀ ($P < 0,001$). Anidulafungina fue más activa que caspofungina cuando se analizó la SCMI₅₀ ($P = 0,002$); no se observaron diferencias cuando se analizó la SCMI₈₀.

También se estudió y comparó la actividad *in vitro* de los tres fármacos frente a las biopelículas agrupadas según actividad metabólica y producción de biomasa (Tabla 24).

Tabla 24. Actividad antifúngica de caspofungina, anidulafungina y micafungina frente a biopelículas de *C.albicans*.

Clasificación Biopelícula	n	Caspofungina (µg/ml)						Anidulafungina (µg/ml)						Micafungina (µg/ml)					
		SCMI ₅₀			SCMI ₈₀			SCMI ₅₀			SCMI ₈₀			SCMI ₅₀			SCMI ₈₀		
		GM	CMI ₅₀	CMI ₉₀	GM	CMI ₅₀	CMI ₉₀	GM	CMI ₅₀	CMI ₉₀	GM	CMI ₅₀	CMI ₉₀	GM	CMI ₅₀	CMI ₉₀	GM	CMI ₅₀	CMI ₉₀
BAM	73	0,6	0,5	≥16	15	≥16	≥16	0,4	0,125	≥16	22	≥16	≥16	0,2	0,031	≥16	4,9	≥16	≥16
MAM	127	0,6	0,25	≥16	13	≥16	≥16	0,3	0,062	≥16	19	≥16	≥16	0,1	≤0,015	≥16	3,6	≥16	≥16
AAM	101	0,5	0,25	≥16	15	≥16	≥16	0,3	0,031	≥16	11	≥16	≥16	0,1	≤0,015	0,5	1,1	2	≥16
BBM	41	1,2	8	≥16	17	≥16	≥16	0,5	0,25	≥16	22	≥16	≥16	0,2	0,031	≥16	12	≥16	≥16
MBM	116	0,6	0,25	≥16	15	≥16	≥16	0,4	0,062	≥16	20	≥16	≥16	0,1	≤0,015	≥16	5,9	≥16	≥16
ABM	144	0,4	0,031	≥16	12	≥16	≥16	0,2	0,25	≥16	13	≥16	≥16	0,1	≤0,015	2	0,9	4	≥16
Global	301	0,6	0,25	≥16	14	≥16	≥16	0,3	0,062	≥16	17	≥16	≥16	0,1	≤0,015	≥16	2,6	≥16	≥16

BAM, baja actividad metabólica; MAM, moderada actividad metabólica, AAM, alta actividad metabólica; BBM, baja biomasa; MBM, moderada biomasa; ABM, alta biomasa.

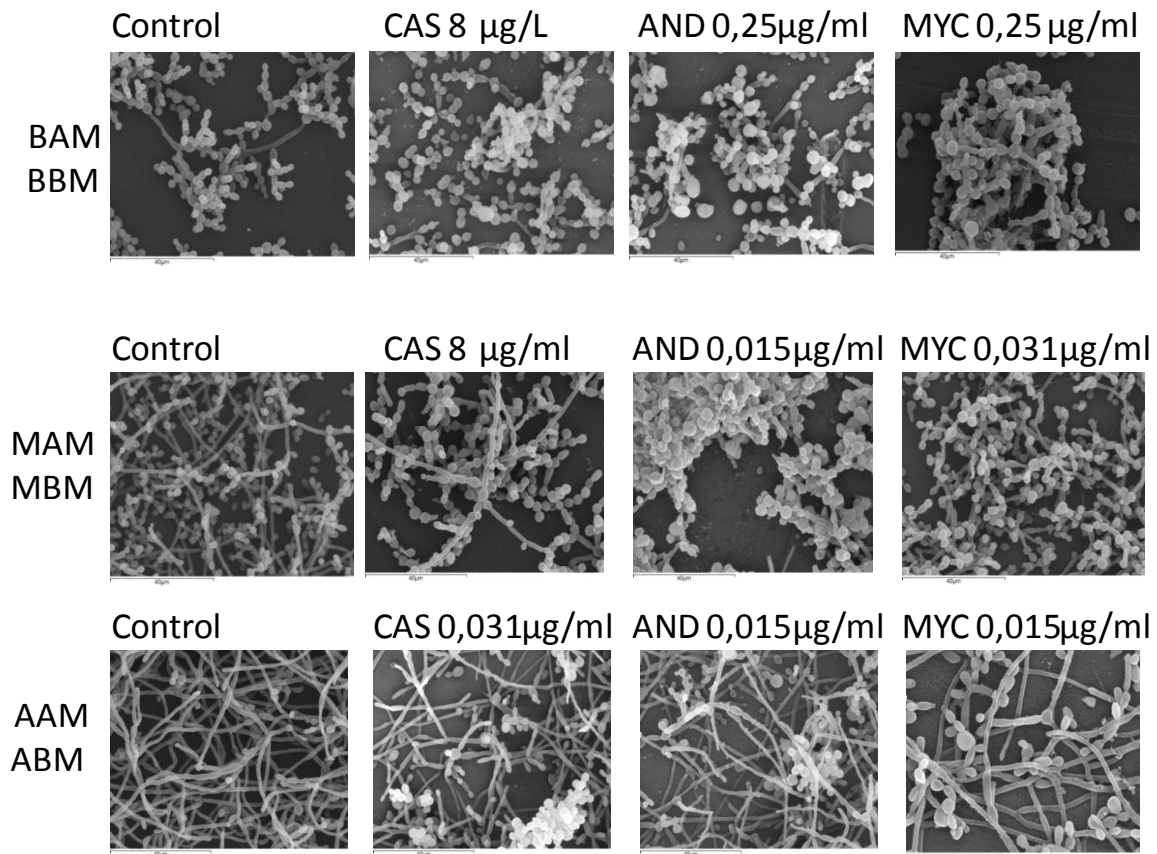
Las biopelículas con elevada actividad metabólica fueron significativamente más sensibles a micafungina que aquellas con baja y moderada actividad metabólica ($P < 0,001$), independientemente de la definición de la CMI sécil elegida; el mismo efecto se observó al estudiar la producción de biomasa: los aislados con elevada biomasa fueron significativamente más sensibles a micafungina que los aislados con baja y moderada biomasa ($P < 0,001$). Anidulafungina fue más activa frente a las biopelículas con elevada actividad metabólica que frente a aquellas con moderada o baja actividad metabólica, sólo cuando se analizó la SCMI₈₀ ($P = 0,027$). Caspofungina mostró la menor actividad anti-biopelícula, independientemente de la actividad metabólica o la producción de biomasa.

Para confirmar las diferencias observadas entre las tres equinocandinas en general y según la actividad metabólica y la producción de biomasa, se utilizó microscopía electrónica de barrido para estudiar la estructura de la biopelícula antes y después del tratamiento con equinocandinas (Figuras 12 y 13).

Ninguna de las equinocandinas produjo cambios considerables en la estructura de las biopelículas con baja actividad metabólica o baja biomasa cuando se comparó con las biopelículas no tratadas, ni siquiera a concentraciones de 16 µg/ml, que fue la concentración más alta estudiada.

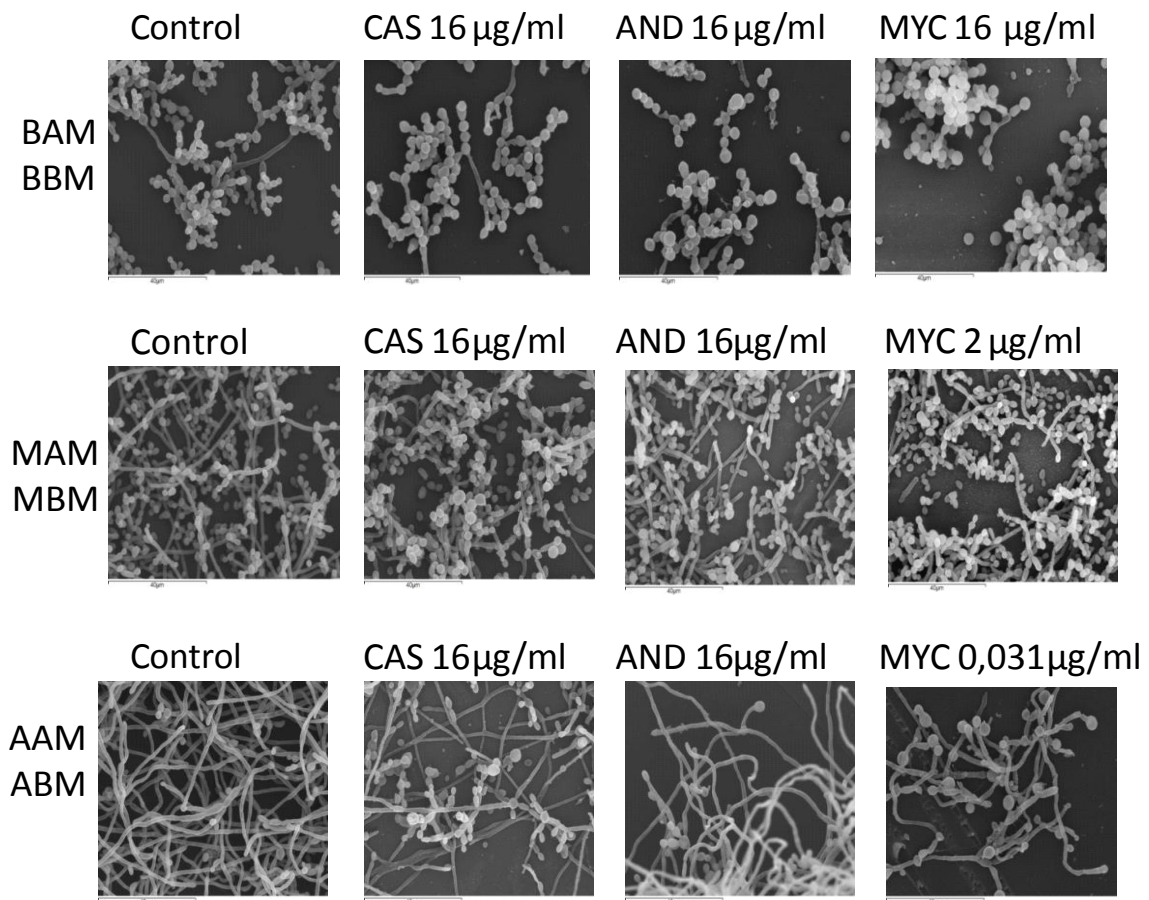
Para las biopelículas con moderada actividad metabólica/biomasa, micafungina promovió la aparición de blastosporas hinchadas y una estructura de hifas menos enmarañada en comparación con las biopelículas no tratadas, independientemente de si la CMI sécil analizada fue 50% u 80%. Por el contrario, el efecto de las equinocandinas restantes varió con la CMI sécil elegida. Anidulafungina promovió la formación de blastosporas agrupadas y una estructura de hifas menos densa cuando se utilizó la SCMI₅₀, mientras que el número de blastosporas agrupadas disminuyó

considerablemente cuando la SCMI₈₀ fue estudiada (Figuras 12 y 13). Caspofungina condujo a la formación de blastosporas hinchadas muy visibles cuando se analizó la SCMI₈₀.



BAM, baja actividad metabólica; MAM, moderada actividad metabólica, AAM, alta actividad metabólica; BBM, baja biomasa; MBM, moderada biomasa; ABM, alta biomasa. CAS, Caspofungina, AND, anidulafungina, MYC, micafungina.

Figura 12. Micrografía electrónica de barrido que muestra las estructuras de biopelículas con diferentes grados de producción de biomasa y actividad metabólica después del tratamiento con micafungina, anidulafungina y caspofungina a una concentración igual a la SCMI₅₀ del aislado estudiado. Ampliación X1200.



BAM, baja actividad metabólica; MAM, moderada actividad metabólica, AAM, alta actividad metabólica; BBM, baja biomasa; MBM, moderada biomasa; ABM, alta biomasa. CAS, Caspofungina, AND, anidulafungina, MYC, micafungina.

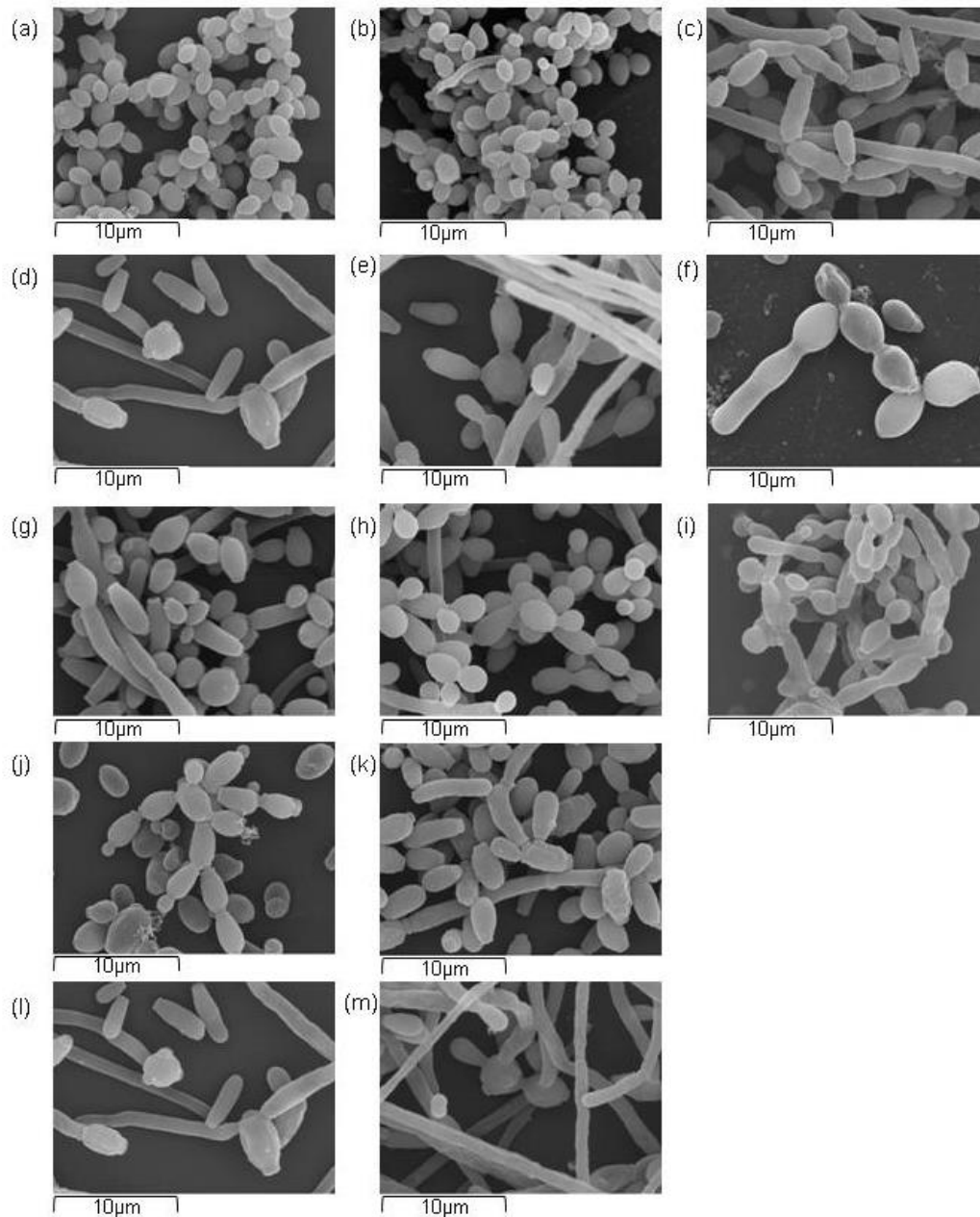
Figura 13. Micrografía electrónica de barrido que muestra las estructuras de biopelículas con diferentes grados de producción de biomasa y actividad metabólica después del tratamiento con micafungina, anidulafungina y caspofungina a una concentración igual a la SCMI₅₀ del aislado estudiado. Ampliación X1200.

3.4. Producción de biopelículas y actividad anti-biopelícula de las equinocandinas y anfotericina B liposomal en especies de levaduras resistentes a equinocandinas.

Se estudió la capacidad de formar biopelículas en cepas de *Candida* spp. con mutaciones en los genes *fks* que confieren resistencia a equinocandinas, así como en cepas de otros géneros intrínsecamente resistentes a estos fármacos. Los resultados mostraron que la estructura de la biopelícula de las cepas de *Candida* con mutaciones en los genes *fks* no difería considerablemente de las cepas salvajes y era consistente con el patrón específico de especie (Tabla 25 y Figura 14).

Tabla 25. Formación de biopelículas de cepas de *Candida* spp. con mutaciones en los genes *fks* (n=5), aislados de levaduras de otros géneros intrínsecamente resistentes a las equinocandinas (n=12), y cepas de tipo salvaje usadas como control.

Mutación <i>fks</i>	Especie	Biomasa	Actividad Metabólica
F641S <i>fks</i> 1	<i>C. albicans</i>	1,16 (MBM)	0,19 (MAM)
Δ649 <i>fks</i> 2	<i>C. glabrata</i>	0,03 (BBM)	0,20 (AAM)
S645F <i>fks</i> 1	<i>C. tropicalis</i>	1,84 (ABM)	0,17 (MAM)
F641L <i>fks</i> 1	<i>C. tropicalis</i>	0,77 (MBM)	0,15 (MAM)
R647G <i>fks</i> 1	<i>C. tropicalis</i>	2,33 (ABM)	0,14 (MAM)
Tipo Salvaje	<i>C. albicans</i>	0,47 (MBM)	0,18 (MAM)
Tipo Salvaje	<i>C. albicans</i>	0,86 (MBM)	0,16 (MAM)
Tipo Salvaje	<i>C. glabrata</i>	0,16 (BBM)	0,24 (AAM)
Tipo Salvaje	<i>C. glabrata</i>	0,25 (BBM)	0,21 (AAM)
Tipo Salvaje	<i>C. tropicalis</i>	0,94 (MBM)	0,13 (MAM)
Tipo Salvaje	<i>C. tropicalis</i>	1,04 (MBM)	0,10 (MAM)
Tipo Salvaje	<i>C. tropicalis</i>	1,98 (ABM)	0,17 (MAM)
Tipo Salvaje	<i>C. tropicalis</i>	1,75 (ABM)	0,16 (MAM)
Tipo Salvaje	<i>C. tropicalis</i>	1,92 (ABM)	0,14 (MAM)
Tipo Salvaje	<i>C. tropicalis</i>	2,32 (ABM)	0,18 (MAM)
Intrínsecamente R	<i>A. adenivorans</i>	0,05 (BBM)	0,01 (BAM)
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	0,05 (BBM)	0,01 (BAM)
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	0,13 (BBM)	0,03 (BAM)
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	0,13 (BBM)	0,03 (BAM)
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	0,06 (BBM)	0,01 (BAM)
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	0,09 (BBM)	0,01 (BAM)
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	0,09 (BBM)	0,01 (BAM)
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	0,06 (BBM)	0,01 (BAM)
Intrínsecamente R	<i>T. asahii</i>	0,11 (BBM)	0,01 (BAM)
Intrínsecamente R	<i>T. asahii</i>	0,08 (BBM)	0,03 (BAM)
Intrínsecamente R	<i>T. dermatis</i>	0,29 (BBM)	0,02 (BAM)
Intrínsecamente R	<i>T. japonicum</i>	0,54 (MBM)	0,13 (MAM)



a) *C. glabrata* tipo salvaje, (b) *C. glabrata* $\Delta 649$ *fks2*, (c) *Trichosporon japonicum*, (d) *C. tropicalis* tipo salvaje, (e) *C. tropicalis* S645F *fks1*, (f) *Rhodotorula mucilaginosa*, (g) *C. albicans* tipo salvaje, (h) *C. albicans* F641S *fks1*, (i) *Arxula adenivorans*, (j) *C. tropicalis* tipo salvaje, (k) *C. tropicalis* F641L *fks1*, (l) *C. tropicalis* tipo salvaje (m) *C. tropicalis* R647G *fks1*.

Figura 14. Estructura de la biopelícula producida por cepas de *Candida* spp con mutaciones en los genes *fks*, cepas de tipo salvaje con el mismo perfil de biopelícula, y especies de otros géneros intrínsecamente resistentes a equinocandinas. Aumento de X5000.

Los aislados de otras levaduras de género diferentes de *Candida* intrínsecamente resistentes a equinocandinas formaron biopelículas mayoritariamente con baja biomasa (Tabla 25), con una estructura caracterizada por la ausencia de hifas y una baja densidad de células unidas a la superficie plástica (Figura 14). En el caso de *Trichosporon* spp. la biopelícula se caracterizó por la presencia de pseudohifas y artrosporas, mientras que la biopelícula de *Rhodotorula* spp. estaba predominantemente formada por blastosporas con una forma ovalada alargada.

La actividad antifúngica de micafungina, anidulafungina, caspofungina y anfotericina B liposomal frente a las formas planctónicas se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Sensibilidad a micafungina, caspofungina, anidulafungina y anfotericina B liposomal de la forma planctónica de los aislados de *Candida* y de otros géneros con diferentes patrones de resistencia a las equinocandinas y controles de cepas tipo salvaje.

Tipo de Resistencia	Especies	CMI Planctónica (µg/ml)			
		CAS	MYC	AND	L-AmB
F641S FKS1	<i>C. albicans</i>	0,5	1	0,25	0,062
Δ649 FKS2	<i>C. glabrata</i>	4	2	1	0,25
S645F FKS1	<i>C. tropicalis</i>	0,5	1	2	0,25
F641L FKS1	<i>C. tropicalis</i>	0,13	0,125	0,062	0,25
R647G FKS1	<i>C. tropicalis</i>	0,13	0,25	0,062	0,25
Tipo Salvaje	<i>C. albicans</i>	0,13	≤0,015	≤0,015	0,125
Tipo Salvaje	<i>C. albicans</i>	0,06	≤0,015	≤0,015	0,25
Tipo Salvaje	<i>C. glabrata</i>	0,13	≤0,015	≤0,015	0,25
Tipo Salvaje	<i>C. glabrata</i>	0,06	≤0,015	≤0,015	0,5
Tipo Salvaje	<i>C. tropicalis</i>	0,13	≤0,015	≤0,015	0,25
Tipo Salvaje	<i>C. tropicalis</i>	0,13	0,031	≤0,015	0,125
Tipo Salvaje	<i>C. tropicalis</i>	0,13	0,031	0,031	0,25
Tipo Salvaje	<i>C. tropicalis</i>	0,13	0,031	≤0,015	0,25
Tipo Salvaje	<i>C. tropicalis</i>	0,13	0,031	≤0,015	0,25
Tipo Salvaje	<i>C. tropicalis</i>	0,13	≤0,015	≤0,015	0,125
Intrínsecamente R	<i>A. adenivorans</i>	0,25	0,125	0,5	1
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	2	≥16	≥16	2
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	≥16	≥16	≥16	1
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	≥16	≥16	≥16	0,125
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	≥16	≥16	≥16	0,25
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	≥16	≥16	≥16	0,25
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	1	≥16	≥16	1
Intrínsecamente R	<i>R. mucilaginosa</i>	1	≥16	≥16	0,25
Intrínsecamente R	<i>T. asahii</i>	≥16	≥16	≥16	≥16
Intrínsecamente R	<i>T. asahii</i>	≥16	≥16	≥16	≥16
Intrínsecamente R	<i>T. dermatis</i>	≥16	≥16	≥16	≥16
Intrínsecamente R	<i>T. japonicum</i>	≥16	≥16	≥16	8

MYC, Micafungina, AND, anidulafungina, CAS, caspofungina, L-AmB, anfotericina B liposomal.

Las tres equinocandinas mostraron una pobre actividad frente a aislados con mutaciones en los genes *fks* y aislados intrínsecamente resistentes a las equinocandinas. Por el contrario, anfotericina B liposomal mostró una alta actividad frente a aislados de *Candida* con mutaciones y *Rhodotorula*, pero no frente a *Trichosporon* spp.

La sensibilidad antifúngica de las formas sésiles se muestra en la Tabla 27.

Tabla 27. Sensibilidad antifúngica a las equinocandinas y anfotericina B liposomal expresada como una reducción del 50% y del 80% de la actividad metabólica de la biopelícula (SCMI₅₀ y SCMI₈₀, respectivamente).

		SCMI ₅₀ (µg/ml)			SCMI ₈₀ (µg/ml)		
		<i>fks</i>	Salvajes	Int. R	<i>fks</i>	Salvajes	Int. R
MYC	MG	0,99	0,02	11,28	18,38	0,09	19,03
	CMI ₅₀	2	≤0,015	≥32	≥32	≤0,015	≥32
	CMI ₉₀	16	0,125	≥32	≥32	≥32	≥32
	Rango	(≤0,015- 16)	(≤0,015 - 0,125)	(0,031 - ≥32)	(2 - ≥32)	(≤0,015 - ≥32)	(0,25 - ≥32)
AND	MG	1,74	0,04	15,05	32	0,28	20,09
	CMI ₅₀	2	0,031	≥32	≥32	0,062	≥32
	CMI ₉₀	≥32	0,5	≥32	≥32	≥32	≥32
	Rango	(0,062 - ≥32)	(≤0,015 - 0,5)	(0,062 - ≥32)	(≥32 - ≥32)	(0,031 - ≥32)	(0,125 - ≥32)
CAS	MG	1,51	0,14	6,71	12,13	0,37	32
	CMI ₅₀	2	0,125	≥32	≥32	0,25	≥32
	CMI ₉₀	≥32	≥32	≥32	≥32	≥32	≥32
	Rango	(0,062 - ≥32)	(≤0,015 - ≥32)	(0,125 - ≥32)	(0,5 - ≥32)	(0,031 - ≥32)	(≥32 - ≥32)
L-AmB	MG	0,14	0,29	0,38	2,64	21,11	5,64
	CMI ₅₀	0,062	0,25	0,25	8	≥32	≥32
	CMI ₉₀	4	≥32	≥32	≥32	≥32	≥32
	Rango	(0,031 - 4)	(0,062 - ≥32)	(≤0,015 - ≥32)	(0,125 - ≥32)	(4 - ≥32)	(≤0,015 - ≥32)

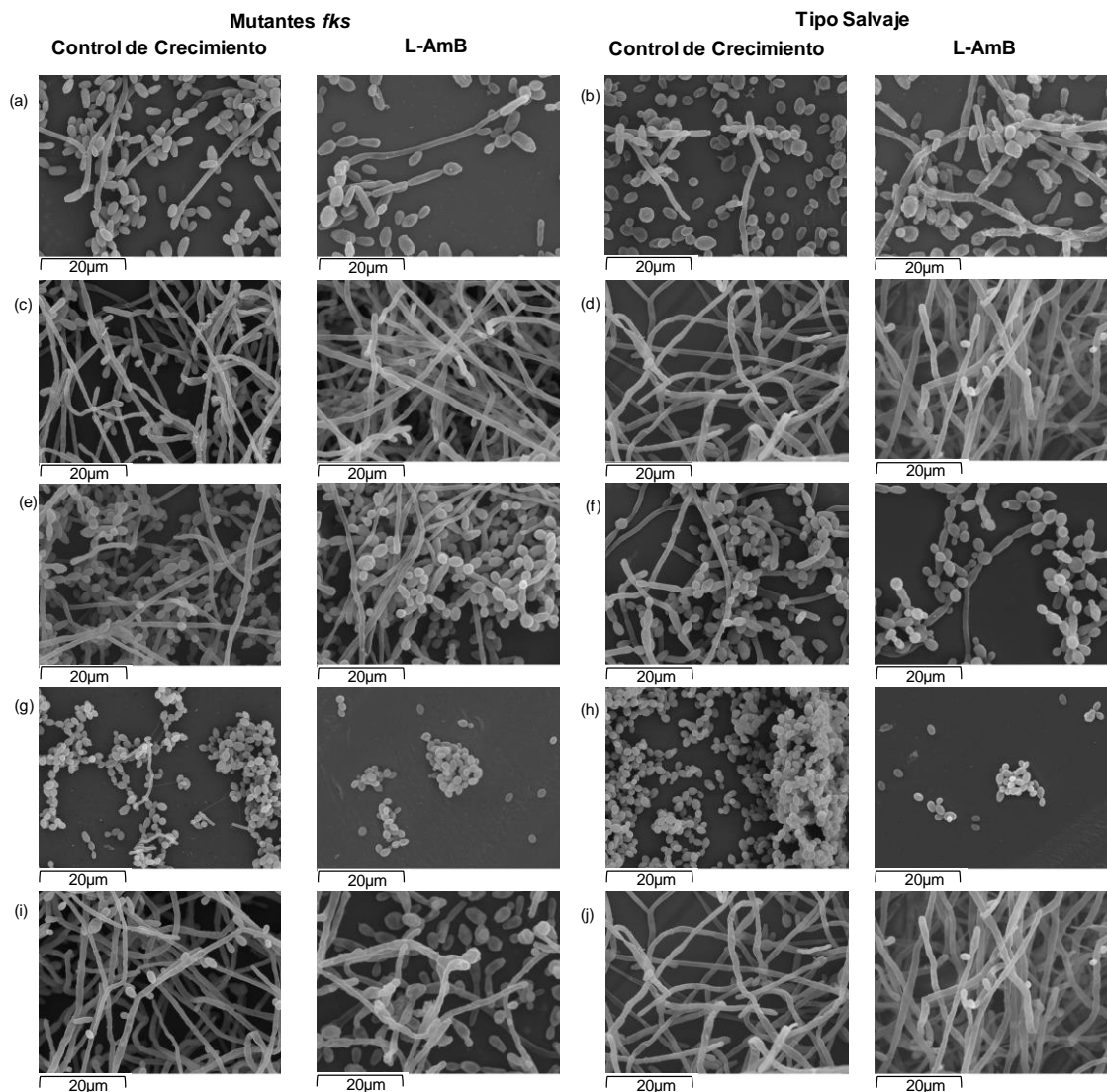
MYC, Micafungina, AND, anidulafungina, CAS, caspofungina, L-AmB, anfotericina B liposomal, *fks*, Cepas con mutaciones en los genes *fks*. Salvajes, cepa de tipo salvaje, Int. R, cepas de levaduras de géneros diferentes de *Candida* intrínsecamente resistentes a equinocandinas. MG, media geométrica.

Basándose en la SCMI₅₀, anfotericina B liposomal fue el fármaco más activo (0,29 µg/ml), seguido de micafungina (0,67 µg/ml), anidulafungina (1,15 µg/ml), y caspofungina (1,21 µg/ml) ($P < 0,001$). Sin embargo, cuando se usó una SCMI más estricta (SCMI₈₀), la micafungina (2,63 µg/ml) fue el fármaco más activo, seguido de anidulafungina (4,49 µg/ml), caspofungina (5,13 µg/ml) y anfotericina B liposomal (µg/ml) ($P < 0,001$). Los aislados de *Candida* de tipo salvaje fueron los más sensibles a las tres equinocandinas ($P < 0,001$), mientras que los aislados de *Candida* con mutaciones en los genes *fks* fueron los más sensibles a anfotericina B liposomal, independientemente de si se estudió la SCMI₅₀ o SCMI₈₀, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 27).

Anfotericina B liposomal presentó la mayor actividad frente a biopelículas formadas por aislados con resistencia adquirida ($P = NS$) o resistencia intrínseca ($P < 0,05$) a las equinocandinas; sin embargo, se observó que las biopelículas formadas por *C. tropicalis* eran altamente resistentes a la anfotericina B liposomal, fármaco que fue incapaz de lograr una reducción del 80% en la actividad metabólica de la biopelícula. Cuando se eliminaron los aislados de tipo salvaje de *C. tropicalis* del análisis, la media geométrica de las CMI (y el rango de CMIs) de anfotericina B liposomal para la SCMI₅₀ y SCMI₈₀ fue 0,015 $\mu\text{g/ml}$ (0,062-0,25 $\mu\text{g/ml}$) y 11,31 $\mu\text{g/ml}$ (4 - 32 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente.

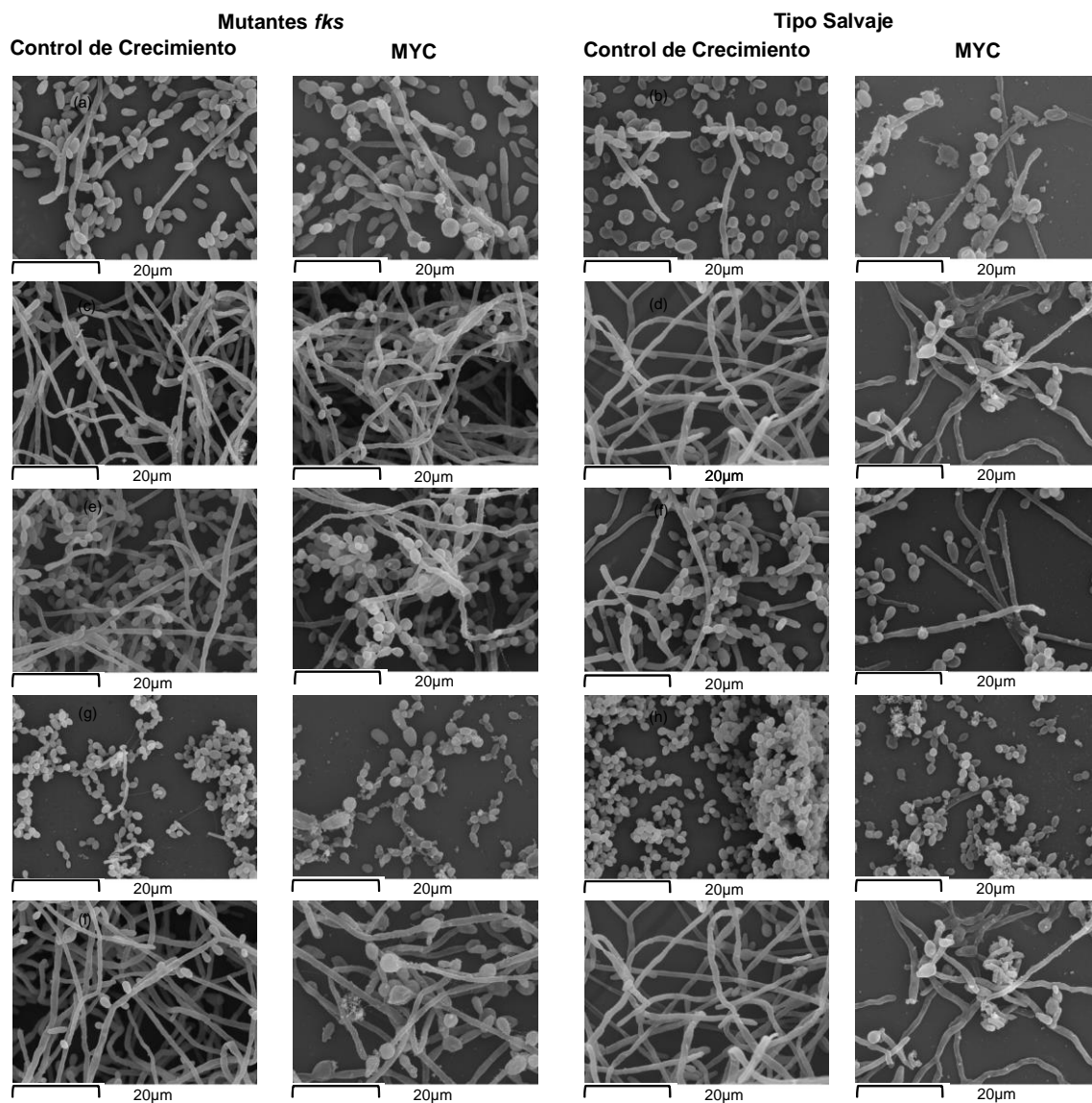
Se utilizó microscopía electrónica de barrido para investigar el efecto de anfotericina B liposomal y micafungina en las biopelículas de *Candida* (Figuras 15 y 16). La anfotericina B liposomal indujo cambios sutiles en *C. albicans* (tanto en las biopelículas de las cepas con mutaciones en los genes *fks* como en las de tipo salvaje) con la presencia de hifas arrugadas y una estructura ligeramente menos densa. El efecto antifúngico en las biopelículas de *C. glabrata* consistió en una disminución prominente en el número de blastosporas (tanto en los aislados de tipo salvaje como en los mutantes *fks*).

Por último, se estudiaron cinco aislados de *C. tropicalis* (tres presentaban biopelículas con elevada biomasa [dos cepas con las mutaciones R647G y S645F *fks1* respectivamente y el correspondiente aislado de tipo salvaje] y dos presentaban moderada biomasa [una cepa con la mutación F641L *fks1* y el correspondiente control de tipo salvaje]). Anfotericina B liposomal tuvo un impacto limitado en la estructura de las biopelículas de los aislados con elevada biomasa, mientras que condujo a hifas arrugadas y a una estructura menos densa en las biopelículas de moderada biomasa. El impacto de la micafungina en las biopelículas preformadas difirió entre los aislados con mutaciones en los genes *fks* y las cepas de *Candida* de tipo salvaje: las biopelículas formadas por cepas de tipo salvaje fueron moderadamente afectadas, mientras que las formadas por los aislados con mutaciones en los genes *fks* permanecieron mayoritariamente inalteradas, con la excepción de la cepa de *C. glabrata* $\Delta 649$ *fks2*, que mostró una ligera disminución en la densidad de la biopelícula.



(a) *C. tropicalis* F641L *fks1* (control del crecimiento, $SCMI_{80} = 16 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina liposomal B); (b) *C. tropicalis* de tipo salvaje (control del crecimiento, $SCMI_{80} = 16 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina liposomal B); (c) *C. tropicalis* R647G *fks1* (control del crecimiento, $SCMI_{80} = 8 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina liposomal B); (d) *C. tropicalis* de tipo salvaje (control del crecimiento, $SCMI_{80} = 16 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina liposomal B); (e) *C. albicans* F641S *fks1* (control del crecimiento, $SCMI_{80} = 0,125 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina liposomal B); (f) *C. albicans* de tipo salvaje (control del crecimiento, $SCMI_{80} = 16 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina liposomal B); (G) *C. glabrata* $\Delta 649$ *fks2* (control del crecimiento, $SCMI_{80} = 0,125 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina liposomal B); (h) *C. glabrata* de tipo salvaje (control del crecimiento, $SCMI_{80} = 4 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina liposomal B); (i) *C. tropicalis*; S645F *fks1* (control del crecimiento, $SCMI_{80} = 16 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina liposomal B); (j) *C. tropicalis* de tipo salvaje (control del crecimiento, $SCMI_{80} = 16 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina liposomal B).

Figura 15. Microscopía electrónica de barrido que muestra la estructura de las biopelículas formadas por las cepas de *Candida* mutantes *fks* y los controles de tipo salvaje después del tratamiento con una concentración de anfotericina B liposomal igual al $SCMI_{80}$ de cada aislado. Aumento de X2000.



(a) *C. tropicalis* F641L *fks1* (control del crecimiento, SCMI₈₀ = 16 µg/ml de micafungina); (b) *C. tropicalis* de tipo salvaje (control del crecimiento, SCMI₈₀ = 0,015 µg/ml de micafungina); (c) *C. tropicalis* R647G *fks1* (control del crecimiento, SCMI₈₀ = 16 µg/ml de micafungina); (d) *C. tropicalis* de tipo salvaje (control del crecimiento, SCMI₈₀ = 0,031 µg/ml de micafungina); (e) *C. albicans* F641S *fks1* (control del crecimiento, SCMI₈₀ = 16 µg/ml de micafungina); (f) *C. albicans* de tipo salvaje (control del crecimiento, SCMI₈₀ = 8 µg/ml de micafungina); (g) *C. glabrata* Δ649 *fks2* (control del crecimiento, SCMI₈₀ = 2 µg/ml de micafungina); (h) *C. glabrata* de tipo salvaje (control del crecimiento, SCMI₈₀ = 0,015 µg/ml de micafungina); (i) *C. tropicalis* S645F *fks1* (control del crecimiento, SCMI₈₀ = 16 µg/ml de micafungina); (j) *C. tropicalis* de tipo salvaje (control del crecimiento, SCMI₈₀ = 0,031 µg/ml de micafungina).

Figura 16. Microscopía electrónica de barrido que muestra la estructura de las biopelículas formadas por las cepas de *Candida* mutantes *fks* y los controles de tipo salvaje después del tratamiento con una concentración de micafungina igual al SCMI₈₀ de cada aislado. Aumento de X2000.

3.5. Comparación de la actividad antifúngica de micafungina y anfotericina B frente a biopelículas de *C. tropicalis*.

Se estudió la formación de biopelículas en 54 aislados de *C. tropicalis* y su sensibilidad antifúngica a micafungina, anfotericina B y anfotericina B liposomal. La mayoría de los aislados presentaron alta biomasa ($n = 45$), y el resto moderada biomasa ($n = 6$) y baja biomasa ($n = 3$). En su mayoría, las biopelículas presentaron moderada ($n=30$) o baja actividad metabólica ($n=19$) y en muy pocos casos alta actividad metabólica ($n=5$).

En la Tabla 28, se presenta la actividad antifúngica frente a la forma planctónica y las biopelículas de los aislados estudiados. Los tres fármacos mostraron una alta actividad antifúngica frente a las formas planctónicas, siendo micafungina el agente más activo ($P < 0,001$). Ninguno de los aislados fue no sensible a equinocandinas o anfotericina B.

Tabla 28. Actividad antifúngica de micafungina, anfotericina B liposomal y convencional frente a formas planctónicas y sésiles de *C. tropicalis*.

		MG	MIC₅₀	MIC₉₀	Rango
Planctónica (µg/ml)	MYC	0,03	0,031	0,031	(≤0,015 - 0,25)
	AmB	0,53	0,5	1	(0,25 - 1)
	L-AmB	0,22	0,25	0,25	(0,062 - 0,5)
SCMI₅₀ (µg/ml)	MYC	0,72	0,5	≥16	(≤0,015 - ≥16)
	AmB	0,87	2	≥16	(≤0,015 - ≥16)
	L-AmB	1,8	2	≥16	(0,031 - ≥16)
SCMI₈₀ (µg/ml)	MYC	9,82	≥16	≥16	(0,062 - ≥16)
	AmB	14,1	≥16	≥16	(2 - ≥16)
	L-AmB	30,4	≥16	≥16	(8 - ≥16)

MYC, micafungina, **AmB**, anfotericina B convencional, **L-AmB**, anfotericina B liposomal. **MG**, media geométrica.

Cuando se utilizó la reducción del 50% de la actividad metabólica en comparación con el control de crecimiento, micafungina y anfotericina B mostraron una actividad similar (media geométrica SCMI₅₀ de 0,72 µg/ml y 0,87 µg/ml, respectivamente). Curiosamente, ambos fármacos fueron significativamente más activos que la anfotericina B liposomal ($P < 0,05$). Cuando se utilizó la reducción del 80% de la actividad metabólica en comparación con el control (SCMI₈₀), micafungina fue significativamente más activa que los otros dos fármacos, y anfotericina B liposomal mostró de nuevo la menor actividad ($P < 0,001$).

Las imágenes de microscopía electrónica mostraron biopelículas de *C. tropicalis* formadas por una densa y gruesa red de hifas en la que anfotericina B liposomal indujo cambios sutiles en la estructura. Por el contrario, la exposición a micafungina promovió alteraciones significativas en la estructura de la biopelícula consistentes en una reducción en el número de hifas y la aparición de blastosporas hinchadas. Estas diferencias confirmaron los resultados de las pruebas de sensibilidad antifúngica, ya que la media geométrica de la SCMI₈₀ fue mucho menor para micafungina que para las dos formas de anfotericina B (Figura 17).

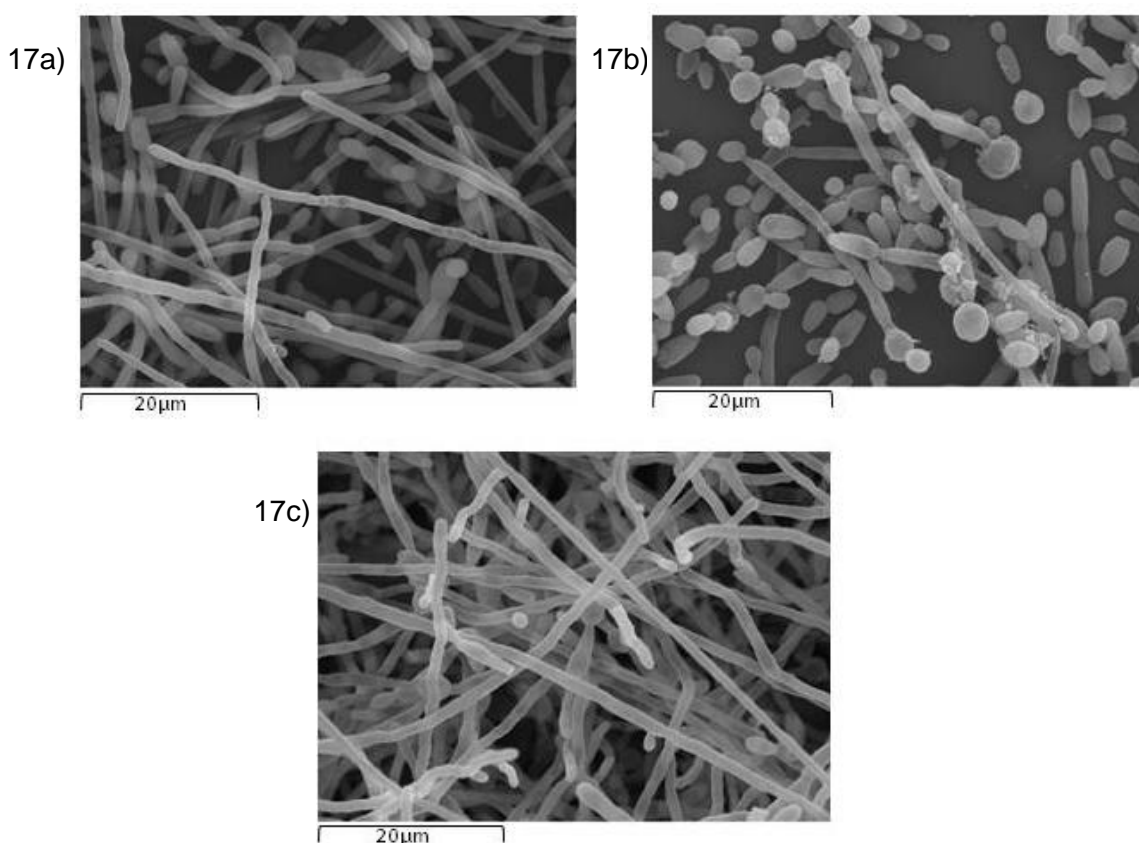


Figura 17. Imágenes de microscopía electrónica que muestran el impacto en la estructura de la biopelícula de *C. tropicalis* de micafungina y anfotericina B liposomal a concentraciones iguales al SCMI₈₀. (a) Control no tratado, (b) Cepa expuesta a micafungina = 0,031 $\mu\text{g/ml}$, (c) Cepa expuesta a anfotericina B liposomal = 16 $\mu\text{g/ml}$. Aumento de X2000.

También se determinó si la cantidad de biomasa de biopelícula o el grado de actividad metabólica influyó en la sensibilidad antifúngica de las biopelículas de *C. tropicalis*, sin embargo, en contraste con los hallazgos previos para *C. albicans*, micafungina no fue más activa frente a cepas con elevada actividad metabólica.

4. Estudio de la patogenicidad de *Candida* spp. en base a la letalidad sobre el modelo de *G. mellonella*.

4.1. Aislamientos de *C. albicans* causantes de candidemia muestran diferentes grados de patogenicidad en el modelo de *Galleria mellonella*.

Las larvas de *G. mellonella* fueron infectadas usando un inóculo ajustado de 5×10^5 levaduras/larva. Este inóculo fue capaz de matar al 50% de las larvas en las 48 horas posteriores a la infección lo que lo hace adecuado para estudiar las diferencias entre cepas en términos de mortalidad en las larvas. Todas las larvas utilizadas en ambos grupos control estaban vivas en el día +7 tras la infección.

La supervivencia media de las larvas infectadas fue de 2 días (rango intercuartílico, 1-3 días), aunque se encontraron diferencias entre aislados. La Figura 18 muestra el porcentaje global de supervivencia desde el día +1 hasta el día +7 tras la infección.

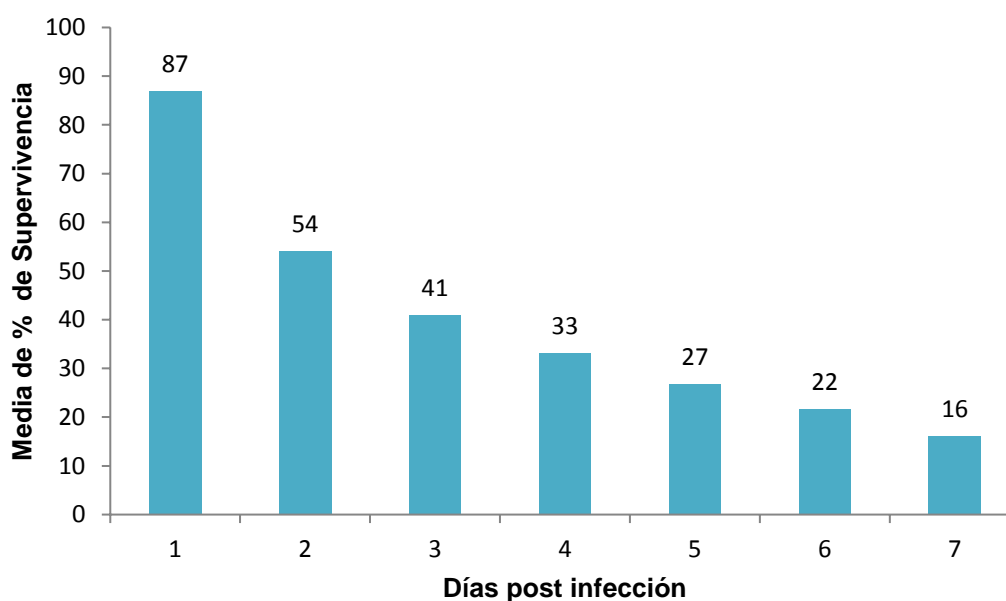


Figura 18. Porcentaje de supervivencia de los 373 aislados de *C. albicans* evaluados entre el día +1 y el día +7 tras la infección.

Según el porcentaje de mortalidad, en el día +1 tras la infección, las cepas se clasificaron como baja patogenicidad (50,1%, mortalidad $\leq 30\%$), moderada patogenicidad (41,8%, mortalidad 31-70%) y alta patogenicidad (8%, mortalidad $> 70\%$).

Los puntos de corte elegidos fueron validados por el análisis de la curva de muerte que mostró el diferente comportamiento de las cepas incluidas en cada categoría en términos de mortalidad ($P < 0,001$) (Figura 19).

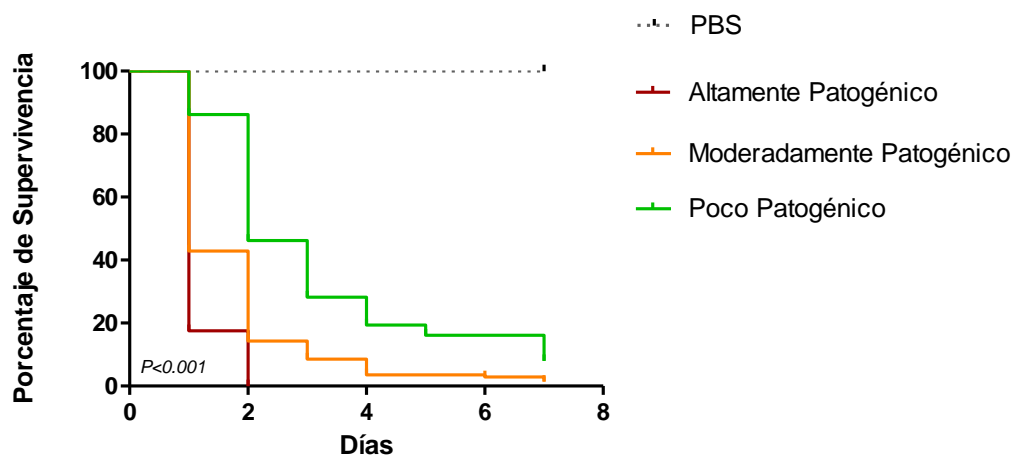


Figura 19. Curvas de supervivencia de larvas de *G. mellonella* infectadas con cepas clasificadas como poco patogénicas ($n = 187$), moderadamente patógenas ($n = 156$) y altamente patógenas ($n = 30$).

No se encontraron diferencias que alcanzaran significación estadística entre los parámetros cinéticos de crecimiento de los aislados clasificados como altamente, moderadamente y poco patogénicos, así como en términos de producción de biopelículas (Tabla 29).

Tabla 29. Parámetros cinéticos de crecimiento [tasa de crecimiento (min^{-1}), crecimiento máximo y tiempo hasta el crecimiento máximo] y grado de formación de biopelículas.

Parámetros Cinéticos y Formación de Biopelículas	Patogenicidad		
	Alta	Moderada	Baja
Tasa de crecimiento (min^{-1})	$2,1 \times 10^{-4} \pm 1,5 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-4} \pm 0,9 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-4} \pm 0,8 \times 10^{-4}$
Máximo crecimiento (OD 492 nm)	$0,72 \pm 0,40$	$0,82 \pm 0,28$	$0,82 \pm 0,24$
Tiempo hasta el máximo crecimiento (min)	1.962 ± 527	1.322 ± 780	1.502 ± 664
Media XTT	$0,14 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,08$	$0,12 \pm 0,08$
Media CV	$0,69 \pm 0,40$	$0,87 \pm 0,58$	$0,77 \pm 0,53$

Se seleccionó un aislado representante de cada uno de los grupos de patogenicidad para estudiar la invasividad de las cepas en los días +1 y +2 tras la infección. La Tabla 30 y la Figura 20 muestran los hallazgos más relevantes.

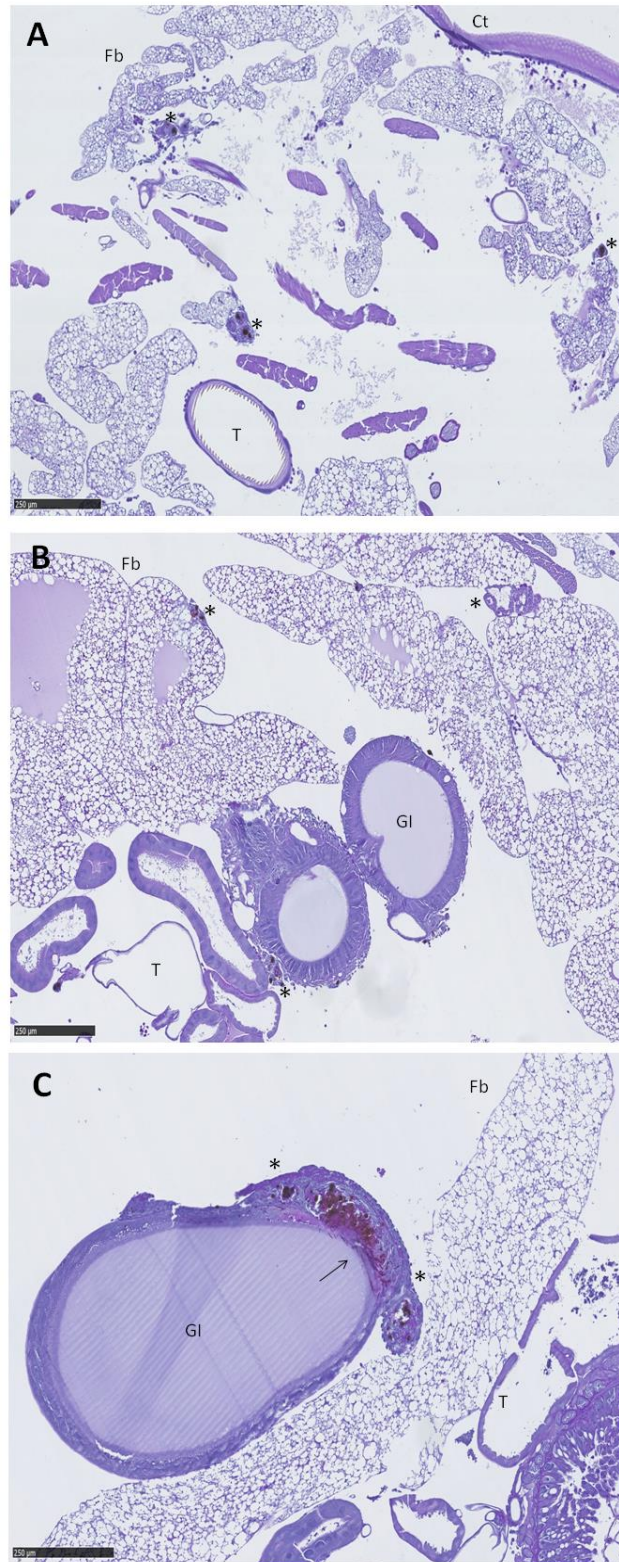
Tabla 30. Observaciones realizadas después del estudio histológico de los tejidos larvarios tras la infección con cepas productoras de diferentes grados de mortalidad en el modelo de *Galleria mellonella*.

Patogenicidad	Día	Nódulos		Melanización	Hemocitos libres	Invasión de Tejidos
		Tamaño	No.			
Baja	1	Pequeño	+++	+	+++	No
	2	Pequeño	+++	++	+++	No
Moderada	1	Pequeño	++	++	+	No
	2	Mediano	++	++	+	Si
Alta	1	Grande	++	+++	-	Si
	2	Grande	++	+++	-	Si

Se encontraron diferencias histológicas en las larvas infectadas por aislados de los tres grupos estudiados. Las cepas con baja patogenicidad no presentaron signos notables de invasión en los tejidos en los días +1 y +2 tras la infección, sólo pequeños nódulos y hemocitos abundantes sugiriendo una respuesta inmune eficaz capaz de controlar la invasión.

Los aislados con moderada patogenicidad no presentaron signos de invasión tisular al día +1 tras la infección y la histología se caracterizó por la presencia de un número moderado de nódulos y abundantes signos de melanización como signo de respuesta inmune, aunque este fue limitado ya que en el día +2 tras la infección las levaduras fueron capaces de invadir el tejido.

Las cepas altamente patógenas fueron capaces de invadir el tejido en el día +1 tras la infección; el grado de melanización y la presencia de grandes nódulos fueron signos indicativos de infección avanzada que indujo la muerte de las larvas a los 2 días tras la infección.



Ct, cutícula. Fb, Cuerpo graso. GI, Tracto gastrointestinal. T, traquea. Asterisco (*) muestra nódulos, y flechas (→) invasión de tejido.

Figura 20. Estudio histológico de las larvas de *G. mellonella* infectadas por cepas con baja patogenicidad (A), moderada patogenicidad (B) y alta patogenicidad (C) en el día +1 tras la infección.

4.2. *C. guilliermondii* complex se caracteriza por una alta resistencia a los antifúngicos pero baja mortalidad atribuible: análisis de 22 casos de candidemia

Se estudiaron 22 casos de candidemia causados por cepas de *C. guilliermondii* complex y se compararon con 337 episodios causados por *C. albicans* (episodios recogidos en el estudio CANDIPOP (Guinea et al., 2014) con el fin de describir a los pacientes con infección por especies de este complejo.

Para preservar la suposición de independencia de las observaciones, sólo el primer episodio de candidemia registrado para un paciente individual se incluyó en el análisis, y los episodios causados simultáneamente por diferentes especies de *Candida* fueron excluidos. Por lo tanto, los 22 episodios de *C. guilliermondii* se compararon finalmente con 337 episodios de *C. albicans* (Tabla 31).

El análisis univariado mostró que los pacientes infectados por *C. guilliermondii* tenían más probabilidades de padecer neoplasia o neoplasia subyacente o de haber sido sometidos a trasplante de órganos sólidos. En general, el 59% de estos pacientes habían recibido tratamiento inmunosupresor en el mes anterior al diagnóstico. La exposición previa a antifúngicos y la presencia de catéter venoso central de larga duración fue más común en este grupo. Por el contrario, los pacientes con candidemia por *C. albicans* eran mayores, tenían más comorbilidades (por ejemplo, diabetes), y eran más propensos a recibir nutrición parenteral total.

La presentación clínica de la candidemia fue menos grave en los pacientes infectados por *C. guilliermondii* que en los infectados por *C. albicans*. Ninguno de los pacientes infectados por *C. guilliermondii* presentó shock séptico o sepsis grave al inicio de la candidemia. Por otra parte, las infecciones por *C. guilliermondii* fueron menos probables durante la hospitalización en la unidad de cuidados intensivos, y el 27,3% de los casos fueron adquiridos en pacientes ambulatorios aunque todos menos uno de los pacientes estaba relacionado con la atención de salud (Tabla 31).

Tabla 31. Comparación de las características basales y los datos clínicos de los pacientes con candidemia causada por *C. guilliermondii* y *C. albicans*.

Variable	<i>C. guilliermondii</i> (n=22)	<i>C. albicans</i> (n=337)	Valor de <i>P</i>
Demográficos			
Edad media, años	50,9 (10,0-67,7)	65,2 (45,4-75,8)	<u>0,04</u>
Edad ≥65 años	6 (27,3)	171 (50,7)	<u>0,033</u>
Sexo Masculino	12 (54,5)	185 (54,9)	0,974
Ambulatorios	6 (27,3)	31 (9,2)	<u>0,017</u>
En UCI al diagnóstico	2/16 (12,5)	131/306 (42,8)	<u>0,016</u>
Días en el hospital hasta candidemia ^a	29,0 (13,3-66,5)	19 (11-34)	0,079
Comorbilidades			
Diabetes mellitus	0 (-)	76 (22,6)	<u>0,006</u>
Neoplasia	15 (68,2)	102 (30,3)	<u><0,001</u>
Enfermedad hematológica	6 (27,3)	13 (3,9)	<u><0,001</u>
Fallo renal crónico	4 (18,2)	43 (12,8)	0,509
Transplante de órgano sólido	2 (9,1)	11 (3,3)	0,186
Cirrosis hepática	1 (4,5)	13 (3,9)	0,594
Infección por VIH	1 (4,5)	6 (1,8)	0,36
Factores de riesgo			
Catéter venoso central	19 (86,4)	258 (76,6)	0,288
CVC a largo plazo	7/19 (36,8)	30/258 (11,6)	<u>0,007</u>
Nutrición parenteral	7 (31,8)	176 (52,2)	0,064
Terapia inmunosupresiva ^b	13 (59,1)	68 (20,2)	<u><0,001</u>
Neutropenia (<500 cells/mm ³)	4 (18,2)	10 (3)	<u>0,007</u>
Cirugía abdominal (3 meses)	4 (18,2)	95 (28,2)	0,309
Terapia antifúngica previa ^b	7 (31,8)	53 (15,7)	0,071
Exposición a azoles	5 (22,7)	37 (11)	0,159
Exposición a equinocandinas	0 (-)	9 (2,7)	1
Candidemia de brecha	4 (18,2)	27 (8)	0,11
Fuente de infección			
Primaria	15 (68,2)	201 (59,6)	0,428
Relacionada con el catéter	6 (27,3)	102 (30,3)	0,767
Urológica	0 (-)	22 (6,5)	0,382
Abdominal	0 (-)	9 (2,7)	1
Otras	1 (4,5)	3 (0,9)	0,224
Severidad de la infección			
Shock séptico o sepsis severa	0 (-)	120 (35,6)	<u>0,001</u>

Los valores se reportan como no./total no (%) o mediana (rango intercuartílico) a menos que se indique lo contrario. Valores de *P* significativos se muestran subrayados. UCI, unidad de cuidados intensivos; CVC, catéter venoso central; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana. ^a Sólo incluye candidemia nosocomial y los casos con hemocultivo positivo después de 2 días de hospitalización. ^b Dentro del mes anterior. La terapia inmunosupresora incluye corticosteroides, quimioterapia y otros fármacos inmunosupresores.

Las medidas terapéuticas se muestran en la Tabla 32. Brevemente, la retirada temprana del catéter venoso central fue menos frecuente en los pacientes infectados por *C. guilliermondii* que en los infectados por *C. albicans* (15,8% vs 50,2%, $P = 0,004$).

Tabla 32. Medidas terapéuticas y evolución de pacientes infectados por el complejo *C. guilliermondii* y *C. albicans*.

Medidas terapéuticas (?48 h)	<i>C. guilliermondii</i> (n=22)	<i>C. albicans</i> (n=337)	Valor de <i>P</i>
Terapia antifúngica inicial			
Azoles	11 (50)	171 (50,7)	0,946
Equinocandinas	4 (18,2)	85 (25,2)	0,459
Anfotericina B	5 (22,7)	48 (14,2)	0,346
Combinación de fármacos	1 (4,5)	4 (1,2)	0,272
Medidas terapéuticas (?48 h)			
Retirada de CVC ^a	3/19 (15,8)	127/253 (50,2)	0,004
Hemocultivos de seguimiento ^b	19/22 (86,4)	219/337 (65)	0,04
Candidemia persistente ^c	8/19 (42,1)	57/219 (26)	0,131
Terapia en las primeras 48 h	8/14 (57,1)	82/134 (61,2)	
Dosis subóptimas de fluconazol ^d	5/14 (35,7)	23/134 (17,2)	
Tratamiento antifúngico no dirigido	1/14 (7,1)	29/134 (21,6)	
Respuesta clínica y evolución			
Infección diseminada ^e	4 (18,2)	33 (9,8)	0,265
Candidiasis ocular	3 (13,6)	16 (4,7)	0,102
Endocarditis	1 (4,5)	9 (2,7)	0,473
Sistema nervioso central	-	7 (2,1)	1
Otros	1 (4,5) ^f	3 (0,9) ^f	0,224
Exitus 7 días	1 (4,5)	43 (12,8)	0,497
Exitus 14 días ^g	2 (9,1)	72/335 (21,5)	0,274
Exitus 30 días ^g	3 (13,6)	113/333 (33,9)	0,049

Los valores se muestran como no./total no. (%) o mediana (rango intercuartílico), a menos que se indique lo contrario. CVC, catéter venoso central. ^a En el subgrupo de pacientes adultos con CVC (n = 277), los datos referentes a la retirada de CVC en las primeras 48 horas faltaron en 5 casos en el grupo *C. albicans*. ^b Extracción de hemocultivos de seguimiento ≥ 3 días después del cultivo sanguíneo incidente. ^c Análisis realizado en el subgrupo de pacientes con hemocultivos de seguimiento ≥ 3 días después del cultivo sanguíneo incidente. ^d Fluconazol a <400 mg/día para cepas de *Candida* susceptibles a fluconazol o a cualquier dosis para cepas de *C. guilliermondii*. ^e Tres pacientes tenían ≥ 1 órgano afectado ^f Incluye una infección renal metastásica, una infección pulmonar metastásica y dos casos de diseminación cutánea (uno en un recién nacido prematuro de bajo peso al nacer y el otro en un paciente neutropénico). ^g Se perdió el seguimiento de cuatro pacientes antes del día 30 (2 antes del día 14) en el grupo *C. albicans*.

Sin embargo, no se observaron diferencias entre los pacientes infectados por *C. guilliermondii* y los infectados por *C. albicans* con respecto a la frecuencia de candidemia relacionada con el catéter (27,3% vs 30,3%). El tratamiento antifúngico apropiado temprano fue menos frecuente en los pacientes infectados por *C. guilliermondii* que en los infectados por *C. albicans* (36,4% vs 60,5%, $P = 0,026$), principalmente porque el tratamiento se inició más de 48 horas tras el diagnóstico (8/14, 57,1%) o por tratamiento empírico con fluconazol (5/14, 35,7%).

En cuanto al pronóstico, la candidemia persistente (hemocultivos persistentemente positivos ≥ 3 días después de la toma de sangre en la que se diagnosticó el episodio) tendió a ser más frecuente en los pacientes infectados por *C. guilliermondii* que en los infectados por *C. albicans* (38,5% vs 26%). Sin embargo, la mortalidad tras 30 días fue menor en el grupo de *C. guilliermondii* (13,6% vs 33,9%, $P = 0,049$). Todos los casos fueron causados por *C. guilliermondii* sensu stricto ($n = 17$) o *C. fermentati* ($n = 5$) según la identificación molecular.

La Tabla 33 muestra la sensibilidad antifúngica de los aislados tanto en las formas planctónicas como en las sésiles. El 9% (2/22) de los aislados tenían CMI de fluconazol por encima de los ECOFF, mientras que el 41% (9/22) eran resistentes al fluconazol según los puntos de corte no relacionados con la especie.

Tabla 33. Sensibilidad antifúngica a los azoles, equinocandinas y anfotericina B de los aislados del complejo de *C. guilliermondii* ($n = 22$) y *C. albicans* ($n = 337$) del estudio CANDIPOP (Guinea et al., 2014).

Fármaco	<i>C. guilliermondii</i> complex			<i>C. guilliermondii</i> complex			<i>C. albicans</i>		
	Biopelículas SMIC ₅₀ (µg/ml)			CMI (µg/ml)			CMI (µg/ml)		
	MG	MIC ₉₀	Rango	MG	MIC ₉₀	Rango	MG	MIC ₉₀	Rango
CAS	0,7	32	(0,062 - ≥ 512)	0,3	1	(0,25 - 2)	0,3	0,5	(0,062 - 2)
MYC	8,3	≥ 512	(0,25 - ≥ 512)	0,3	1	(0,25 - 4)	0,03	0,03	(0,031 - 1)
AND	2,5	232	(0,062 - ≥ 512)	1	2	(0,5 - 1)	0,03	0,03	(0,031 - 0,25)
FLU		NR		5,3	16	(0,5 - ≥ 64)	0,21	0,25	($\leq 0,125$ - ≥ 64)
POS		NR		0,1	0,5	(0,031 - 1)	0,02	0,02	($\leq 0,015$ - ≥ 8)
VOR		NR		0,1	0,5	($\leq 0,015$ - 2)	0,02	0,02	($\leq 0,015$ - ≥ 8)
AmB		NR		0,3	1	(0,062 - 0,5)	0,05	0,13	(0,031 - 0,25)

CAS, caspofungina, MYC, micafungina, AND, anidulafungina, FLU, fluconazol, POS, posaconazol, VOR, voriconazol, AmB, anfotericina B, MG, media geométrica. NR, no realizado.

En cuanto a la formación de biopelícula, los aislados presentaron biopelículas con moderada biomasa ($n = 13$) o baja biomasa ($n = 9$), moderada actividad metabólica ($n = 9$), baja actividad metabólica ($n = 12$) o elevada actividad metabólica ($n = 1$). La microscopía electrónica de barrido reveló que las biopelículas del complejo de *C. guilliermondii* se formaron principalmente por una capa de blastosporas sin hifas

o pseudohifas (Figura 21). Se observaron diferencias en la sensibilidad antifúngica entre *C. albicans* y *C. guilliermondii* para todos los fármacos en la forma planctónica ($P < 0,001$). En cuanto a la susceptibilidad de las biopelículas, caspofungina fue el fármaco más activo, seguido de anidulafungina y micafungina (media geométrica SCMI₅₀ de 0,97 $\mu\text{g/ml}$, 3,10 $\mu\text{g/ml}$ y 9,3 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, $P < 0,05$).

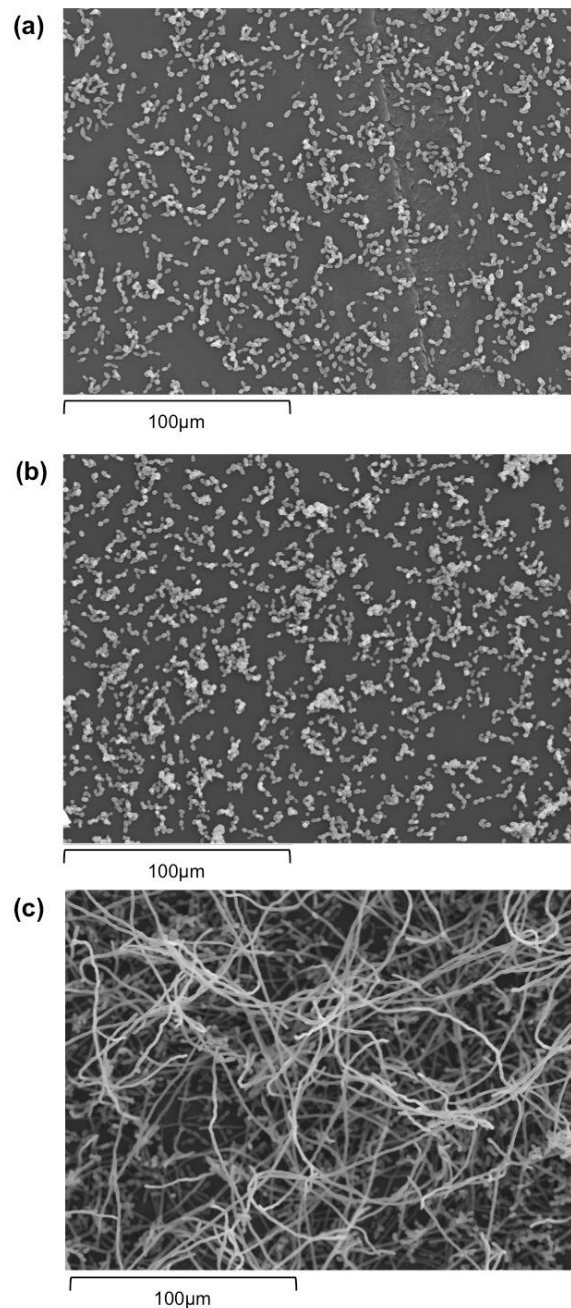


Figura 21. Biopelícula formada por (a) *C. fermentati*, (b) *C. guilliermondii sensu stricto*, y (c) *C. albicans*. Aumento X500.

Los aislados del complejo de *C. guilliermondii* fueron significativamente menos virulentos que los aislados de *C. albicans* (6 vs 1 días de supervivencia media, $P < 0,001$) en el modelo de *G. mellonella* (Figura 22).

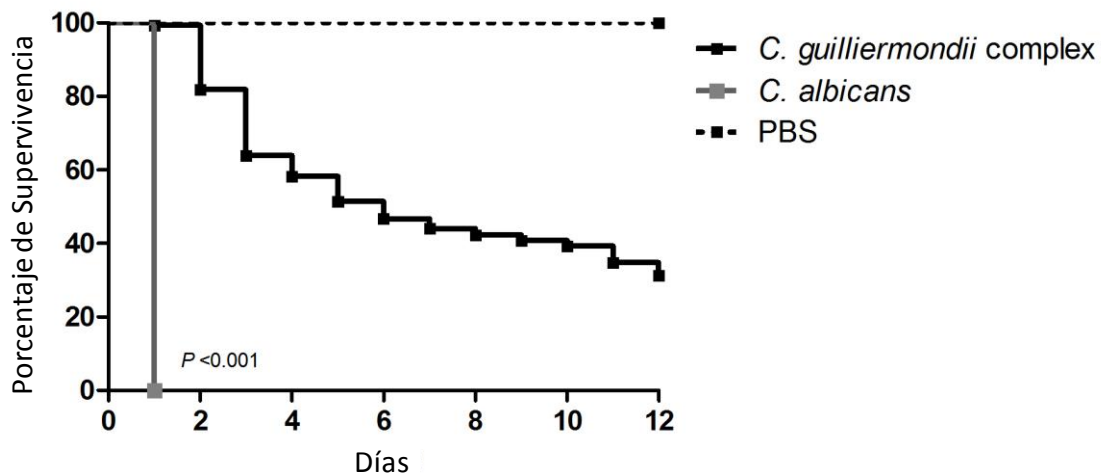


Figura 22. Curvas de supervivencia de *G. mellonella* infectadas con el complejo de *C. guilliermondii* y aislados de *C. albicans* (de 5×10^6 células de levadura/larva) después de 12 días de incubación a 37°C.

Los aislados de *C. fermentati* fueron más virulentos que los de *C. guilliermondii* sensu stricto (4 vs 9,5 días de supervivencia media, $P < 0,001$), aunque el bajo número de aislados de esta especie limitó el análisis. No se encontraron diferencias en cuanto a la formación de biopelículas o en la sensibilidad entre *C. fermentati* y *C. guilliermondii*.

Discusión



El estudio de la infección profunda causada por levaduras, en especial la fungemia, ha sido abordado históricamente bajo el análisis de los pacientes que la sufrían. Determinar los factores predisponentes de la infección, estudiar el tratamiento antifúngico más efectivo, y analizar el pronóstico de los pacientes ha sido la motivación principal del estudio de esta área de las infecciones fúngicas. Sin embargo, el estudio integral del patógeno desde diferentes puntos de vista microbiológicos, sin tener en cuenta al paciente afectado, ha recibido menos atención. Parece razonable pues que, además del paciente infectado y su manejo clínico, las características propias del patógeno tengan una contribución y protagonismo especial.

Esta tesis ha pretendido estudiar las cepas causantes de fungemia en pacientes ingresados en un gran hospital de Madrid desde diferentes puntos de vista microbiológicos, algunos de ellos poco representados en la literatura médica, estructurándose en los siguientes cuatro bloques: conocimiento de la epidemiología precisa de las especies causantes de fungemia, evolución de la resistencia a antifúngicos y sus bases moleculares a lo largo del tiempo, tipificación molecular de las cepas como herramienta para trazar el estudio de brotes hospitalarios, y por último, estudio de algunos factores de virulencia específicos de *Candida* spp.

1. Identificación y sensibilidad antifúngica de levaduras causantes de fungemia.

En el estudio poblacional CANDIPOP, estudio de referencia para conocer la epidemiología de la fungemia en España, la incidencia reportada de candidemia fue de 8,1 casos por cada 100.000 habitantes; la mayoría de los pacientes se encontraban en edades extremas de la vida y se observó una incidencia particularmente alta en neonatos (96,4 casos por cada 100.000 habitantes) (Guinea et al., 2014). La mayoría de los pacientes con candidemia presentaron numerosas co-morbilidades, entre las que destacaron la diabetes mellitus, los tumores sólidos o enfermedad hematológica maligna, la presencia de catéteres venosos centrales, la nutrición parenteral, la cirugía durante el mes previo al diagnóstico de candidemia, y la exposición previa a azoles y/o equinocandinas (Guinea et al., 2014).

El estudio exhaustivo de la epidemiología de las especies causantes de fungemia es clínicamente relevante ya que permite elegir de la manera más precisa posible la terapia antifúngica empírica cuando aún no se cuenta con la identificación a nivel de especie. Esto se debe a que la especie se relaciona, con frecuencia, con un perfil de sensibilidad característico. La distribución de especies causantes de fungemia muestra diferencias geográficas marcadas. En prácticamente todos los estudios poblacionales importantes, *C. albicans* es la principal especie causante de la infección, mientras que en el resto de especies se encuentran diferencias geográficas. En el norte de Europa y América del Norte, *C. glabrata* es la segunda especie más frecuentemente aislada, mientras que *C. parapsilosis* es la segunda especie en los estudios llevados a cabo en España, Italia, Grecia, y América Latina (Guinea, 2014). El análisis de especies causantes de fungemia en el Hospital Gregorio Marañón en el periodo comprendido entre 2007 y 2013 demuestran un patrón de distribución de especies típico de España y del sur de Europa, con *C. albicans* a la cabeza seguido de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, y el resto de especies. No se encontraron diferencias marcadas entre la distribución de especies de este hospital cuando se comparó con la reportada en el estudio CANDIPOP (Guinea et al., 2014).

Otro aspecto que ha ido cobrando relevancia durante los últimos años es la revolución que ha supuesto la aplicación de la biología molecular a la taxonomía de los hongos (Criseo et al., 2015). Muchas especies anteriormente consideradas como tal han demostrado ser, en realidad, un complejo de especies filogenéticamente emparentadas (Tavanti et al., 2005, Sullivan et al., 1995, Alcoba-Florez et al., 2005, Correia et al., 2006). El impacto clínico real de esta reclasificación taxonómica es aún

incierto, pero en el caso de *Aspergillus*, las especies crípticas del complejo *A. fumigatus* son más resistentes a los antifúngicos que las cepas de *A. fumigatus* sensu stricto (Alastruey-Izquierdo et al., 2014). Cuando menos, el conocimiento preciso de las especies causantes de fungemia es importante para conocer bien la epidemiología de la enfermedad, y para ello es imprescindible el uso de herramientas moleculares puesto que la identificación fenotípica – que ha sido la base para identificar las levaduras en el laboratorio de microbiología clínico hasta hace bien poco – puede derivar en identificaciones erróneas. Las cepas estudiadas en esta tesis doctoral fueron identificadas molecularmente tras secuenciación de la región ITS con objeto de encontrar especies crípticas en los complejos *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, y *C. guilliermondii*, así como la potencial presencia de episodios de fungemia causados por más de una especie (fungemias mixtas). En el complejo de *C. albicans*, el 1,7% de los aislados se identificaron como *C. dubliniensis*; la proporción de especies crípticas del complejo *C. parapsilosis* fue baja (3,5%), y no se encontró ninguna especie críptica en el complejo de *C. glabrata*. Por el contrario, se encontró una elevada proporción de especies crípticas en el complejo *C. guilliermondii* (30%).

La identificación convencional funcionó bien, en líneas generales, para conocer la especie causante de la infección; sin embargo, en un 7% de las cepas esta hubiese sido insuficiente. Así, la identificación molecular no sólo puso de manifiesto la presencia de especies crípticas de los complejos anteriormente discutidos, sino que se desveló la presencia de algunos episodios de fungemias mixtas que habían pasado desapercibidos. En el 20% de los episodios de fungemia mixta, la identificación convencional (basada en los medios de cultivo cromogénicos y las pruebas de identificación bioquímicas) no fue capaz de detectar correctamente las dos especies, hecho que fue confirmado por identificación molecular. En tres casos de fungemia mixta correctamente identificada por los métodos convencionales, la identificación molecular desveló la presencia de una mezcla de secuencias indicando que los aislados no estaban puros, aunque fenotípicamente lo pareciera. Esta mezcla de especies resultó en alteraciones en los patrones de sensibilidad y por tanto de las tasas de resistencia al presentarse falsa resistencia a fluconazol (*C. parapsilosis* complex, n=3) o falsa resistencia a equinocandinas (*C. glabrata*, n=2; *C. albicans*, n=1). Por este motivo, estos aislados fueron excluidos del estudio epidemiológico de sensibilidad antifúngica. Estos hallazgos ponen de manifiesto la necesidad de realizar identificación molecular en aquellos aislados clínicamente significativos no sólo para conocer la epidemiología de las especies sino también para conocer los patrones de sensibilidad antifúngica.

Realizar identificación molecular con carácter asistencial rutinario en todos los aislados levaduriformes coleccionados en el laboratorio de microbiología clínica no es factible por su coste en términos de tiempo empleado, en términos económicos, en términos de la necesidad de contar con personal cualificado, y porque los tiempos de respuesta no serían operativos. Sin embargo, esta aproximación debe de reservarse, al menos, para aquellos aislados procedentes de muestras invasoras. Sin embargo, puede ser necesario identificar a los aislados de manera precisa a nivel de especie en pacientes con colonización multifocal (pacientes críticos), o en alertas como pueden ser la presencia de especies con alta capacidad de producir brotes nosocomiales como es el caso de *C. auris* (Schelenz et al., 2016, Pinhati et al., 2016). En este escenario, el MALDI-TOF es una herramienta útil para identificar correctamente un gran número de aislados de *Candida* en un formato más adaptable al día a día del laboratorio. Dado que las librerías con las que cuenta este sistema son aún limitadas para algunas especies poco frecuentes, como es el caso de especies relacionadas con *C. famata* y el complejo *C. guilliermondii* (específicamente *C. fermentati*), este sistema se debe de acoplar a la identificación molecular en situaciones poco concluyentes (Sendid et al., 2013, Lacroix et al., 2014).

Aunque se ha comentado que las diferentes especies de *Candida* tienen un perfil de sensibilidad antifúngica característico, no se puede excluir la presencia de aislados con resistencia antifúngica adquirida en especies en las que este fenómeno es poco frecuente. Es este sentido, está indicado estudiar la sensibilidad a antifúngicos de uso sistémico en, al menos, las cepas de levaduras causantes de infección invasora. La mayoría de estudios en los que se ha determinado la tasa de resistencia a antifúngicos se han diseñado de manera que se coleccionaron un número de cepas más o menos elevado durante periodos relativamente cortos de tiempo (Puig-Asensio et al., 2014, Guinea et al., 2014, Peman et al., 2012). Por este motivo, la evolución de la tasa de resistencia a diferentes antifúngicos no se conoce bien.

Tiene sentido poder clasificar a los aislados como sensibles o resistentes en base a puntos de corte clínicos bien validados para al menos fluconazol y las tres equinocandinas, fármacos que se usan para el tratamiento de la mayoría de los episodios de fungemia. Desafortunadamente los métodos estandarizados para el estudio de la sensibilidad a antifúngicos (EUCAST y CLSI) sólo proponen puntos de corte para las especies de *Candida* que con más frecuencia producen infección invasora. Esto hace que las cepas de especies menos frecuentes sean difíciles de clasificar en base a su sensibilidad a antifúngicos. Para paliar esta carencia, se podrían usar puntos de corte no especie-específicos, aunque estos sólo están

disponibles para fluconazol y *Candida* spp. cuando se usa el método EUCAST. Otro aspecto a tener en cuenta al estudiar las tasas de resistencia, es que la caspofungina presenta una alta variabilidad inter-laboratorio y unas CMI's elevadas para *C. glabrata* y *C. krusei* que no se corresponden necesariamente con resistencia, por lo que EUCAST ha decidido no establecer puntos de corte para este fármaco y se recomienda interpretar con precaución los resultados cuando se usa el CLSI (Espinel-Ingroff et al., 2013).

Uno de los objetivos de este proyecto de tesis fue estudiar la tasa de resistencia a antifúngicos en cepas productoras de fungemia en un gran hospital, además de poder ofrecer datos de la evolución de esta tasa a lo largo del tiempo. Por ese motivo, era necesario incluir a la totalidad de las cepas aisladas de sangre de pacientes infectados, y aplicar así de manera alternativa puntos de corte epidemiológicos o puntos de corte no especie-específicos en aquellas combinaciones antifúngico-especie de las que se carecía de puntos de corte clínicos. Además, ya que para el caso de las especies diferentes a *Candida* no se cuenta con ninguno de estos parámetros, y dado que en la mayoría de estudios estas especies son excluidos, se optó por dar dos tasas de resistencia: una que sólo incluyese a las especies de *Candida* y otra que incluyese a todas las levaduras causantes de fungemia.

En la mayoría de los países la tasa de resistencia a fluconazol se mantiene estable entre un 3% y 9% y depende del número de cepas con sensibilidad disminuida a éste fármaco como son *C. glabrata* y *C. krusei* (Prigitano et al., 2016, Cleveland et al., 2015, Doi et al., 2016, Asmundsdottir et al., 2012, Tavec et al., 2016). En aquellos estudios poblacionales en que las cepas de *C. glabrata* se consideran uniformemente como resistentes, estas tasas se pueden incrementar hasta un 30% (Arendrup et al., 2011a, Arendrup et al., 2005). Sin embargo, la resistencia a equinocandinas es un problema emergente en otros países como los Estados Unidos, donde se ha descrito un incremento en la proporción de cepas de *C. glabrata* con mutaciones en los genes *FKS* (Alexander et al., 2013). Recientemente se han descrito casos en los que cepas de *C. glabrata* generan resistencia en el seno del tratamiento (Shields et al., 2012, Shields et al., 2015), y se ha encontrado que cepas con mutaciones en el gen de reparación *MSH2* exhiben una mayor propensión a la adquisición de resistencia a múltiples antifúngicos (Healey et al., 2016).

La resistencia a fluconazol evaluada en diferentes estudios llevados a cabo en España durante la última década varía entre el 7% y el 8% (Almirante et al., 2005, Peman et al., 2012, Guinea et al., 2014). La resistencia a las equinocandinas

reportada en el estudio CANDIPOP fue muy baja (<2%) (Guinea et al., 2014). Son particularmente útiles, en términos de comparación, los datos provenientes del estudio CANDIPOP puesto que estas cepas se recogieron en un periodo de estudio incluido parcialmente en el periodo de recogida de las cepas analizadas en esta tesis.

La tasa de resistencia a fluconazol en *Candida* spp. que muestran las cepas de levaduras causantes de fungemia en el Hospital Gregorio Marañón fue menor al 4%, dato que no difiere demasiado de la tasa global de resistencia a fluconazol publicada en el estudio CANDIPOP. La resistencia a equinocandinas se mantuvo muy baja (<2%) y fue similar a la reportada previamente en el CANDIPOP (Guinea et al., 2014). En general, la tasa de resistencia a equinocandinas dependió de la presencia de especies de género diferentes de *Candida* que son intrínsecamente resistentes a estos fármacos. Las tasas de resistencia tanto a azoles como a equinocandinas se mantuvieron estables durante el periodo de estudio (2007 – 2013), no observándose una tendencia a su aumento salvo en aquellos años en los que la proporción de episodios causados por géneros diferentes de *Candida* eran mayores.

Los pacientes infectados con cepas resistentes a fluconazol o equinocandinas, presentaron condiciones subyacentes graves, la mayoría de ellos presentaban cáncer (50%), diabetes (23%), o cirugías realizadas durante el mes previo al desarrollo de la infección (17%). La mitad de los pacientes infectados por cepas resistentes a fluconazol habían recibido previamente tratamiento con azoles y se encontraban ingresados, mayoritariamente en servicios médicos (Medicina Interna). Por el contrario, sólo el 14% de los pacientes infectados con cepas resistentes a equinocandinas habían recibido tratamiento previo con equinocandinas y se encontraban en unidades de cuidados críticos.

A pesar de que el porcentaje de cepas resistentes a equinocandinas se mantiene por debajo del 5%, la detección de cepas resistentes de manera rápida y eficaz es de gran importancia para el laboratorio de Microbiología Clínica. Los métodos de microdilución son la técnica de referencia para el estudio de la sensibilidad antifúngica (Pfaller and Diekema, 2012), sin embargo, son procedimientos largos y difíciles de implementar en la rutina del laboratorio clínico. Por ello, las técnicas comerciales como el E-test son de gran importancia, pero desafortunadamente no hay estudios que los comparen con la metodología de EUCAST y el E-test para el caso de micafungina.

En estudios previos, el acuerdo esencial entre E-test y EUCAST para caspofungina varió entre el 87,7% y el 94% (Dannaoui et al., 2010, Chryssanthou y

Cuenca-Estrella, 2002). Se ha observado que el acuerdo esencial entre E-test y EUCAST para micafungina fue también alto tras 24 horas de incubación, sin embargo el 17% de las cepas no crecieron adecuadamente y el E-test tuvo que leerse tras 48 horas, sobre todo para cepas de *C. parapsilosis*, lo que puede ser un inconveniente de esta técnica. El acuerdo categórico encontrado también fue alto y dependiente de especie, aunque fue menor cuando el E-test se leyó tras 24 horas de incubación. La presencia de falsa resistencia, sobre todo en *C. albicans*, podría inducir el uso de un antifúngico alternativo a las equinocandinas (fundamentalmente fluconazol). Sin embargo, el impacto de este cambio sería limitado, ya que la mayoría de los aislados de *C. albicans* son sensibles a fluconazol. El acuerdo esencial entre E-test y EUCAST para micafungina fue elevado tras 24 horas de incubación, por lo que el E-test es un procedimiento efectivo para el despistaje de cepas resistentes a micafungina. Las cepas resistentes, principalmente de *C. albicans*, deben ser confirmadas por un método de microdilución de referencia, en cualquier caso.

Existen ciertos fenómenos observados *in vitro* que pueden alterar la determinación de la CMI como son el “trailing” o efecto arrastre a los azoles y el efecto paradójico a las equinocandinas. Si bien un estudio reciente apunta a que se trata más de un artefacto del laboratorio que realmente un fenómeno de relevancia clínica (Rueda et al., 2017), el impacto clínico de estos fenómenos es incierto puesto que no hay demasiados estudios que los hayan correlacionado con el pronóstico del paciente infectado.

Fluconazol tiene actividad fungistática frente a *Candida*, y el “trailing” es una demostración de la incapacidad de este fármaco para inhibir completamente el crecimiento fúngico. Esto explica que la CMI de fluconazol se considere como una reducción mayor o igual al 50% del crecimiento de la levadura comparado con el control de crecimiento (CLSI, 2008, Arendrup et al., 2012a); una inhibición completa de crecimiento haría que todas las cepas se clasificaran como resistentes. Con esta definición, cualquier crecimiento igual o menor al 49% no debe ser considerado como resistencia si no “trailing”. Se ha postulado que variaciones en la temperatura de incubación y el pH del medio de cultivo permiten reducir el “trailing” lo que sugiere que se trata de un fenómeno observado *in vitro* y no de verdadera resistencia (Agrawal et al., 2007). Sin embargo no existe una graduación en cuanto a la producción de “trailing”, algo fácilmente medible al determinar la CMI usando un método espectrofotométrico como EUCAST.

Se encontró que un alto porcentaje de cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis* producían este fenómeno, algo que coincide con estudios previos realizados con la metodología CLSI (Lee et al., 2007, Dornelas-Ribeiro et al., 2012). Estas dos especies no sólo son las que tienen un mayor número de cepas productoras de “trailing”, si no que también presentaron el mayor porcentaje de cepas altamente productoras de “trailing” si bien es cierto que no se encontró ningún genotipo concreto que produjera “trailing” de forma prominente. Se propusieron puntos de corte para clasificar a las cepas en base a su producción de efecto arrastre calculando el porcentaje de recrecimiento de *Candida* comparado con el control de crecimiento. Esta clasificación permitió agrupar a las cepas en base a su producción de “trailing” como arrastre residual (0,1-5%), arrastre ligero (6% -10%), arrastre moderado (11% -15%) y arrastre alto (>15%). Las cepas sensibles a fluconazol pueden entonces clasificarse como “trailing” residual con un “trailing” de hasta 5% mientras que las altamente productoras de “trailing” pueden tener un crecimiento de hasta 49%. Estas diferencias pueden tener un impacto clínico y se necesitan futuros estudios para correlacionar la clínica con la presencia del efecto arrastre.

El efecto paradójico se caracteriza por una atenuación en la actividad antifúngica de las equinocandinas a concentraciones por encima de la CMI (Vanstraelen et al., 2013). De la misma manera, al utilizar un método espectrofotométrico para determinar la CMI, se puede cuantificar objetivamente el recrecimiento en los pocillos incluso aunque este sea muy reducido, y cuantificar así el efecto paradójico incluso a concentraciones muy bajas (Vanstraelen et al., 2013, Walraven and Lee, 2013). El procedimiento descrito en esta tesis permite estudiar este fenómeno a la par que se evalúa la sensibilidad antifúngica del aislado en cuestión por medio del procedimiento EUCAST. La base fisiológica de producción de efecto paradójico no se conoce bien y las explicaciones propuestas incluyen respuesta al daño celular, aumento en la síntesis de quitina, y sobreexpresión de vías de señalización celular implicadas en la respuesta de las levaduras al estrés que son responsables de la integridad celular (Vanstraelen et al., 2013, Steinbach et al., 2015, Shields et al., 2011). Todos estos cambios permiten a la levadura adaptarse a un ambiente con altas concentraciones de equinocandinas, por lo que el efecto paradójico se considera como un mecanismo de tolerancia más que un mecanismo de resistencia (Rueda et al., 2014).

Las concentraciones a las que el efecto paradójico se observa *in vitro* son fácilmente alcanzables en plasma (Vanstraelen et al., 2013), y se ha demostrado que la adición de suero a las placas multipocillos revierte este efecto, probablemente

debido a la unión de las equinocandinas con la albumina con la consiguiente disminución de la fracción libre de fármaco (Shields et al., 2011). Esto sugiere que el efecto paradójico puede tener un impacto clínico en aquellos nichos anatómicos en los que la fracción libre de equinocandinas es alta. Existen pocos estudios que analicen el impacto clínico del efecto paradójico, y se ha demostrado que regímenes con dosis altas de equinocandinas son igual de efectivos que regímenes a las dosis recomendadas (Betts et al., 2009, Safdar et al., 2007). Sin embargo, escenarios en los que se alcanzan concentraciones muy altas de equinocandinas podrían ser un factor de riesgo para el desarrollo de efecto paradójico. Esto podría producirse en situaciones de uso de terapia antifúngica de sellado de catéter que requiere el empleo de concentraciones de fármaco hasta 1000 veces por encima de la CMI durante un periodo largo de tiempo (Walraven and Lee, 2013). Deben llevarse a cabo estudios futuros para evaluar el impacto del efecto paradójico en las terapias de sellado del catéter. Curiosamente, de la misma manera que ocurría con el “trailing”, *C. tropicalis* (62%) y *C. albicans* (10,7%) fueron las especies que presentaron un mayor porcentaje de efecto paradójico a las equinocandinas. Debe advertirse que *C. tropicalis* se ha relacionado con elevadas tasas de mortalidad (Munoz et al., 2011), por lo que se considera que pacientes infectados con estas especies tienen peor pronóstico y evolución.

En este primer capítulo, se muestra que a pesar que el número de episodios de fungemia causados por especies crípticas fue bajo, la identificación molecular proporciona un correcto entendimiento de la epidemiología de la fungemia. Las tasas de resistencia a equinocandinas y fluconazol son bajas y no parece existir una tendencia al aumento de estos parámetros. Por otra parte, se ha logrado obtener un mejor conocimiento de los efectos asociados al estudio *in vitro* de la sensibilidad antifúngica y se propone una manera práctica y fácil de implementar en el laboratorio para clasificar las cepas de acuerdo al efecto arrastre “trailing” que presenten y al efecto paradójico observado.

2. Caracterización genotípica y estudio de la diversidad clonal de las principales especies de *Candida* causantes de candidemia

El estudio de la identificación a nivel de especie y su sensibilidad a antifúngicos están fuera de duda en cepas con significación clínica. Sin embargo, este abordaje puede ser insuficiente para detectar algunos fenómenos como el origen de la candidemia, la presencia de brotes hospitalarios de infección por *Candida*, o la potencial asociación entre alguna característica fenotípica (resistencia antifúngica, producción de “trailing” o efecto paradójico, elevada virulencia, producción de biopelículas, etc) y genotipos concretos.

La formación de biopelículas permite que *C. albicans* colonice dispositivos médicos plásticos como catéteres y los convierte con frecuencia en el foco de infección (Ferreira et al., 2013, Hasan et al., 2009). El diagnóstico de la candidemia relacionada con el catéter generalmente requiere el aislamiento de la misma especie de *Candida* tanto en el cultivo de la punta del catéter como en el hemocultivo. Sin embargo, en ausencia de genotipado, esta definición podría ser insuficiente en aquellos casos en que los genotipos de las cepas de ambas muestras sean diferentes. Se encontraron genotipos idénticos tanto en el cultivo de la punta del catéter y del hemocultivo en el 91% de los pacientes estudiados con candidemia relacionada con el catéter causada por *C. albicans*. Sin embargo, los genotipos de cepas de ambas muestras fueron diferentes en dos pacientes, sugiriendo que el foco de infección podría ser otro distinto al catéter o que la infección podría ser policlonal. Por lo tanto, se encontró una elevada correlación entre la identificación a nivel de especie y la definición genotípica de candidemia relacionada con el catéter. Sin embargo este estudio estuvo limitado principalmente por el bajo número de pacientes estudiados, la inclusión sólo de pacientes con candidemia relacionada con el catéter causada por *C. albicans*, la falta de cepas procedentes de otros lugares anatómicos en aquellos pacientes donde no coincidían los genotipos de la punta del catéter y hemocultivo, y su diseño retrospectivo (sólo se dispuso de datos de una única colonia por placa) que no permitió estudiar la policlonalidad de la infección.

Por este motivo se llevó a cabo un estudio prospectivo en el que se paliaron algunas de las limitaciones anteriormente comentadas. Se demostró de nuevo que las levaduras obtenidas de los hemocultivos y las puntas de catéter de las muestras de 20 pacientes tenían genotipos idénticos. Considerando a los pacientes con infecciones causadas por dos especies de *Candida* o infectados con dos genotipos en sangre, se determinó que el 15% presentaban infecciones polifúngicas (n=2) o policlonales (n=1).

A pesar de que el número de pacientes estudiados era pequeño, el patrón policlonal pareció ser especie-específico. El genotipo adicional se encontró exclusivamente en el catéter en casos de infección causada por *C. albicans*, mientras que sólo fue encontrado en sangre para *C. parapsilosis*. Estos casos pueden ser explicados por la fuente de infección. El genotipo adicional encontrado en el catéter puede ser una consecuencia de la manipulación del mismo, mientras que los genotipos adicionales encontrados en sangre pueden proceder de otros orígenes (el tracto digestivo o genitourinario). Sin embargo, en dos de los tres pacientes que mostraron policlonalidad, los genotipos estaban muy relacionados genéticamente (microvariantes). Estos datos sugieren que entre los pacientes incluidos en el estudio, una sola cepa era la causante de la infección y se encontraba tanto en la sangre como en la punta del catéter. La razón por la cual hay genotipos que sólo se encuentran en un compartimento no son claras y requieren mayor atención. La definición de microvariante es controvertida y no existe un consenso para definir dos aislados como genéticamente relacionados o diferentes.

El análisis de múltiples colonias por muestra permitió demostrar que la candidemia relacionada con el catéter causada por *C. parapsilosis* fue policlonal hasta en un 14,3% de los pacientes. Para *C. albicans* también se observaron patrones policlonales, pero exclusivamente en las muestras de catéter por lo que no se consideraron infecciones policlonales. La selección de una colonia por muestra pudo revelar genotipos diferentes en sangre y catéter si una colonia de los genotipos minoritarios se hubiese seleccionado seleccionada al azar, infraestimando la policlonalidad (como pudo pasar en el estudio retrospectivo). Se encontró solo un genotipo en los catéteres en cuatro de cinco pacientes con múltiples muestras de catéter estudiadas, mientras que en el otro paciente se encontraron diferentes genotipos colonizadores del catéter. Se desconoce el impacto clínico de esta observación y si los genotipos infrarrepresentados se encontraban sólo en el catéter o si también podrían haberse detectado en sangre de haberse estudiado un mayor número de colonias. Solo un 5% de los pacientes con candidemia relacionada con el catéter presentaron una infección policlonal exclusivamente causada por *C. parapsilosis*. En caso de presencia de diferentes genotipos entre muestras, se recomienda estudiar colonias múltiples de cada muestra.

Los brotes de candidemia pueden ser un problema en las unidades de ingreso de pacientes críticos, particularmente en aquellas de neonatos (Pinhati et al., 2016, Roilides et al., 2003, Lin et al., 2012, Da Silva Ruiz et al., 2012, Hernandez-Castro et al., 2010). A la hora de investigar un brote, es primordial tener una sospecha

epidemiológica que levante la alarma para posteriormente conocer la relación genética entre los aislamientos involucrados. En base a los estudios de tipificación realizados, se ha podido demostrar que existe transmisión paciente-paciente de *Candida* en diversas áreas del hospital y que la vía de infección más común es la contaminación del catéter intravascular por parte del personal sanitario (Barchiesi et al., 2004, Lasheras et al., 2007, van Asbeck et al., 2007). El estudio genotípico de los aislados se suele llevar a cabo cuando existe una sospecha epidemiológica de un brote en una unidad específica del hospital; sin embargo, la presencia de genotipos endémicos de ciertas unidades del hospital puede desvelar la presencia de transmisión paciente-paciente que pasaría desapercibida en ausencia de una sospecha epidemiológica de brote. El estudio de la relación genética entre aislados de *Candida* puede ayudar a detectar genotipos en “cluster” causantes de brotes y permitir implementar medidas de prevención. Un estudio previo del grupo demostró que hasta el 25% de los pacientes infectados por *C. albicans* tenían genotipos en “cluster” y que algunos coincidían temporal y espacialmente en ciertas áreas del hospital (Escribano et al., 2013b). Teniendo esto como base se decidió estudiar la diversidad genética de las cepas causantes de candidemia en pacientes ingresados en el hospital y compararla con la de otro hospital terciario de características similares ubicado en Madrid.

Se encontraron diferencias en el número de “clústers” y en el porcentaje de pacientes en “cluster” en en cada centro, lo que sugiere diferentes tasas en la transmisión paciente-paciente; aunque esto no fue específicamente estudiado podría ser consecuencia de diferencias en el cuidado del catéter o el tipo de paciente estudiado entre hospitales. Un aspecto importante a señalar es la presencia de genotipos compartidos entre los dos hospitales de Madrid, así como el hospital de Roma usado como control. Este fenómeno ha sido previamente descrito en otros estudios que en los que se usaron técnicas de tipado menos discriminatorias y cepas recolectadas únicamente en las unidades de cuidados intensivos (Shin et al., 2011, Asmundsdottir et al., 2008, Maganti et al., 2011, Takakura et al., 2008). El alto porcentaje de genotipos encontrados en más de un centro es difícil de explicar y pueden proponerse diferentes hipótesis. Primero, ciertos genotipos pueden ser mas predominantes en la población o en el ambiente, como previamente ha sido descrito para *Staphylococcus aureus* u otras bacterias denominadas como cepas de alto riesgo que pueden adaptarse al ambiente hospitalario (Baquero and Coque, 2011). Segundo, la posible ausencia de ciclo sexual de estas especies podría permitir que ciertos clones se expandan en el ambiente. Finalmente, los marcadores de microsatélites están limitados por la presencia de homoplasia (alelos con el mismo

tamaño pero diferente secuencia) o la recombinación sexual que puede conducir a cepas con el mismo genotipo pero provenientes de diferentes rutas epidemiológicas (Shin et al., 2011, Eloy et al., 2006). El análisis del genoma completo podría ayudar a identificar si existen varios genotipos con el mismo patrón de microsatélites.

En este segundo capítulo se demuestra una alta correlación entre la identificación a nivel de especie y la definición genotípica de CRC, así como que solo 5% de los pacientes con CRC presentan infección policlonal y que estas son exclusivamente causadas por *C. parapsilosis*. Por otra parte, se demuestra que los “clústers” de *C. albicans* y *C. parapsilosis* causantes de candidemia difieren entre hospitales, sugiriendo diferencias en la transmisión de cepas. Además algunos genotipos se pueden encontrar en pacientes admitidos en diferentes hospitales e incluso en diferentes países.

3. Estudio de la formación de biopelículas por parte de aislados de *Candida* spp. causantes de fungemia y determinación de su sensibilidad a antifúngicos

La formación de biopelículas es una característica importante de *Candida* spp, que explica el potencial de este microorganismo para causar candidemia relacionada con el catéter, y podría explicar la capacidad de algunas cepas de mantenerse en ciertas áreas de hospital y ser responsables de brotes. Por otra parte se ha demostrado, que aquellos pacientes infectados con cepas productoras de biopelícula tienen un peor pronóstico (Tumbarello et al., 2012, Rajendran et al., 2016). Además, las especies que forman biopelículas con la más alta biomasa (*C. tropicalis*) o la mayor actividad metabólica (*C. glabrata*) han sido previamente relacionadas con una evolución desfavorable en los pacientes (Klevay et al., 2008, Lee et al., 2010, Munoz et al., 2011, Ruan et al., 2008). El estudio de la sensibilidad antifúngica es de gran relevancia para un correcto manejo de la candidemia, sin embargo, en muchos casos de infecciones profundas causadas por *Candida*, las levaduras se encuentran agrupadas en biopelículas lo que hace que la acción de los fármacos sea diferente a cuando se encuentran en forma planctónica. Se cree que diversos factores median la resistencia de las biopelículas, uno de los más importantes es la matriz extracelular (Taff et al., 2013, Mitchell et al., 2013, Fernandes et al., 2015).

Las guías actuales de manejo de la candidemia recomiendan la retirada del catéter en caso de candidemia relacionada con el catéter, ya que el pronóstico de la infección mejora una vez que se haya retirado la fuente de la infección (Cornely et al., 2012, Pappas et al., 2016). Sin embargo, retirar el catéter no es siempre posible y los pacientes solo se beneficiarían en aquellos casos donde se confirme que el mismo es la fuente de la infección. Las tres equinocandinas y la anfotericina B liposomal han demostrado gran actividad *in vitro* frente a las biopelículas de *Candida* (Uppuluri et al., 2011, Fiori et al., 2011, Katragkou et al., 2008) por lo que la retirada del catéter podría obviarse en pacientes con candidemia tratados con alguno de estos fármacos (Nucci et al., 2010).

El sellado del catéter con fármacos con actividad anti biopelícula podría ser una opción en aquellos casos donde el catéter no pueda retirarse (Walraven y Lee, 2013), sin embargo esta técnica no se recomienda actualmente en las guías del manejo de la candidemia y se necesitan estudios que validen su efectividad. El primer paso es conocer la sensibilidad *in vitro* de las biopelículas de las principales especies causantes de candidemia relacionada con el catéter. Tomando en cuenta la gran variabilidad observada entre las diferentes cepas y especies de *Candida* en cuanto a

la capacidad de formar biopelículas, surge la duda de si este factor influye sobre la sensibilidad de las biopelículas a los antifúngicos.

Se estudió la producción de biopelículas en una gran colección de cepas aisladas de pacientes con fungemia. Esta colección incluyó no sólo cepas de *C. albicans*, sino otras de especies de *Candida* no-*albicans* así como de otros géneros. Se estudió la biomasa de la biopelícula (cristal violeta), así como la actividad metabólica de las células sésiles en la biopelícula preformada (XTT). Se propusieron puntos de corte para clasificar a las cepas en base a los dos métodos estudiados. Se demostró que existen patrones especie-específicos en la formación de biopelículas y que las principales especies causantes de candidemia relacionada con el catéter son capaces de producir biopelículas con alta actividad metabólica o biomasa.

C. albicans mostró ser la segunda especie en términos de producción de biopelícula y actividad metabólica. En el caso de *C. glabrata* a pesar de que sus biopelículas presentaran la mayor actividad metabólica, su biomasa fue más baja que la de las otras especies estudiadas. Este estudio corrobora otros previos donde se había reportado la alta actividad metabólica de las biopelículas formadas por *C. glabrata* (Ferreira et al., 2013) aunque se demuestra aquí que esta especie forma biopelículas con baja biomasa. Por lo tanto, las células de *C. glabrata* parecen estar muy activas metabólicamente en las biopelículas comparadas con otras especies que producen biopelículas con una estructura más compacta. El efecto opuesto fue observado para *C. tropicalis*, especie que forma biopelículas con elevada biomasa y baja actividad metabólica, con una pared extracelular muy densa que puede dificultar la difusión de nutrientes y oxígeno (Alnuaimi et al., 2013), lo que explicaría que las células se encuentren poco activas metabólicamente dentro de la biopelícula. Las diferencias en la estructura de la matriz de la biopelícula pueden explicar las diferencias observadas entre las biopelículas de *C. tropicalis* y *C. glabrata*. Las cepas de *C. parapsilosis* producen biopelículas caracterizadas por moderada biomasa y moderada actividad metabólica, fue la tercera especie más productora de biopelículas según las dos metodologías. Otras especies de *Candida* y las levaduras de otros géneros formaron biopelículas con baja biomasa y moderada actividad metabólica.

El uso de dos técnicas diferentes ampliamente usadas en la literatura para la cuantificación de la biopelícula de *Candida* permite realizar un mejor estudio de ésta. Dado que las características en la producción de biopelícula son diferentes para cada especie, la comparación y acuerdo entre métodos no fue muy alto, ya que ningún procedimiento es superior al otro, si no que son complementarios. Se demostró por

tanto que existen patrones especie-específicos en la formación de biopelículas en cepas causantes de fungemia y que las principales especies causantes de candidemia relacionada con el catéter son capaces de producir biopelículas con alta actividad metabólica o biomasa. Las técnicas de CV y XTT sirven como procedimientos complementarios para estudiar la formación de biopelícula. A pesar de la alta variación intra-especie observada, no se encontró una asociación entre esta característica y genotipos específicos.

El estudio de la sensibilidad antifúngica en la biopelícula se lleva a cabo mediante el ensayo de reducción de XTT en formazan, proceso mediado fundamentalmente por enzimas mitocondriales y el citocromo P450, así como oxidetasas y flavoproteínas (Altman, 1976). Por tanto, la conversión del XTT es una medición indirecta de la actividad mitocondrial de las células. La energía generada como consecuencia de la actividad mitocondrial puede ser empleada parcialmente para la biosíntesis de la pared celular, y como las equinocandinas inhiben la síntesis de la pared celular, la actividad de las equinocandinas estaría relacionada con los requisitos para la biosíntesis de la pared celular del hongo.

Las levaduras en estado planctónico se encuentran sintetizando la pared celular para su reproducción, por lo que las equinocandinas son capaces de inhibir el crecimiento con concentraciones de hasta 1 µg/ml para *C. albicans*. Cuando las cepas se encuentran en forma de biopelícula, la actividad antifúngica de la micafungina, es dependiente de la actividad metabólica de las células: las biopelículas con baja actividad metabólica son menos sensibles a micafungina, probablemente porque las células se encuentran en una fase estacionaria, mientras que las cepas con moderada o alta actividad metabólica son más sensibles, reflejando el mayor grado de biosíntesis de la pared celular. Este efecto, sin embargo, no es compartido por el resto de equinocandinas a diferencia de estudios realizados con aislados en forma planctónica, donde no se observan diferencias en la actividad antifúngica de las tres equinocandinas (Guinea et al., 2014).

Existen discrepancias en la literatura respecto a este hecho, mientras algunos autores determinan que la micafungina fue más activa que caspofungina y anidulafungina sobre biopelículas de *C. albicans* (Chamilos et al., 2007), otros autores han descrito que anidulafungina fue más activa (Simitsopoulou et al., 2013, Walraven et al., 2014). Los resultados aquí presentados son consistentes con las observaciones de Chamilos y colaboradores (Chamilos et al., 2007) ya que micafungina aparece como el fármaco más activo frente a las biopelículas. Las equinocandinas inhiben la

biosíntesis de la pared celular mediante el bloqueo de la enzima 1,3- β -D-glucano sintetasa (Perlin, 2007). Sin embargo, la interacción entre cada una de las equinocandinas y la diana puede que no sea uniforme, a pesar de que comparten el mismo mecanismo de acción. Hipotéticamente, micafungina se une a la diana de manera más efectiva que las otras equinocandinas, lo que podría explicar su gran actividad frente a las biopelículas de *C. albicans* incluso en estadíos casi inertes de la formación de biopelícula.

La mayoría de los estudios que demuestran la actividad de las equinocandinas frente a biopelículas de *Candida*, no incluyen cepas resistentes por lo que se estudió la actividad antifúngica de las equinocandinas y la anfotericina B sobre biopelículas de *Candida* con resistencia intrínseca o adquirida a las equinocandinas. A pesar de la presencia de mutaciones en el gen *fks* que codifica la β -1,3-D-glucano-sintetasa, estas cepas no vieron alterada su producción de biopelícula y lo hicieron de manera comparable a las cepas "wild-type", aunque como era previsible estas cepas fueron menos sensibles a las equinocandinas que las cepas salvajes en forma de biopelícula. Estudios previos han demostrado que la anidulafungina es la equinocandina con mayor efecto anti biopelícula sobre cepas con mutaciones en los genes *fks* (Walraven et al., 2014), sin embargo, se encontró que caspofungina fue el fármaco más activo. La actividad antifúngica de las equinocandinas sobre cepas resistentes en estado plantónico varía de acuerdo al tipo de mutación en el gen *fks* y este fenómeno también podría presentarse sobre las biopelículas (Arendrup et al., 2012b). Anfotericina B liposomal presentó la actividad anti biopelícula más alta frente a cepas con resistencia intrínseca o adquirida a las equinocandinas, lo que se correlaciona con estudios previos donde se vio que anfotericina B es activa incluso frente a cepas no-*Candida* (Kuhn et al., 2002, Seidler et al., 2010, Ramage et al., 2013). Sin embargo, se observó que las biopelículas de *C. tropicalis* fueron menos susceptibles, hasta el punto de que este fármaco fue incapaz de conseguir una reducción del 80% de la actividad metabólica de la biopelícula.

Las biopelículas de *C. tropicalis* presentan matrices extracelulares densas y ricas en carbohidratos y hexosamina (Fernandes et al., 2015, Al-Fattani y Douglas, 2006, Bizerra et al., 2008). Hasta el 95% de los aislamientos de *C. tropicalis* incluidos en nuestro estudio presentaron una biopelícula con elevada o moderada biomasa. La matriz extracelular densa y gruesa impide la penetración de fármacos y los secuestra, impidiendo su efecto antifúngico (Taff et al., 2013); así mismo cambios en la composición de esteroides de la membrana celular en forma de biopelícula y sobreexpresión de ciertos genes de resistencia pueden afectar la actividad de

anfotericina B sobre *C. tropicalis*. Se determinó si la biomasa o el grado de actividad metabólica de la biopelícula influenciaba la sensibilidad antifúngica de las biopelículas de *C. tropicalis*. Sin embargo, contrariamente a los resultados encontrados con *C. albicans*, micafungina no fue más activa frente a las cepas con alta actividad metabólica. El escaso número de aislados con biopelículas con baja actividad metabólica estudiados podría impedir la obtención de resultados concluyentes. La anfotericina B liposomal no está recomendada como fármaco de primera línea para el tratamiento de la candidiasis invasiva (Cornely et al., 2012). En pacientes en los que se sospeche infección por biopelícula de *C. tropicalis* y en los que no sea posible eliminar la fuente (p. ej. catéter y endocarditis) se debe considerar que la actividad de la anfotericina B liposomal frente a las biopelículas es baja.

En este tercer capítulo, se demuestra que micafungina es la equinocandina más activa frente a las biopelículas de *C. albicans* y que en contraste con aquello observado para micafungina, la actividad antifúngica de caspofungina y anidulafungina no depende de la actividad metabólica o de la estructura de la biopelícula. Las cepas resistentes a equinocandinas producen biopelículas de acuerdo a su patrón de especies. Finalmente, las biopelículas de *C. tropicalis* muestran una marcada resistencia a anfotericina B liposomal.

4. Estudio de la patogenicidad de *Candida* spp. en base a la letalidad sobre el modelo de *G. mellonella*.

A parte de la formación de la biopelícula y el estudio de la sensibilidad antifúngica de la misma, existen otros aspectos que también influyen sobre la virulencia de *Candida* spp. El estudio de la letalidad de una determinada cepa sobre un modelo animal permite conocer la virulencia de la misma y estos resultados pueden correlacionarse con la evolución clínica de los pacientes infectados. En los últimos años se han empleado modelos animales novedosos para el estudio de infecciones fúngicas (Fuchs et al., 2010b, Sandoval-Denis et al., 2014, Paredes et al., 2014, Jacobsen et al., 2014, Fernandez-Silva et al., 2014, Rahman et al., 2012). El modelo animal invertebrado de *G. mellonella* es uno de los más utilizados por presentar numerosas ventajas, permitiéndole estudiar un gran número de cepas. Las larvas de *G. mellonella* presentan un sistema inmune primitivo con muchos aspectos similares al de los vertebrados que permite estudiar *in vivo* el proceso de infección y la capacidad de las cepas de evadir el sistema inmunitario (Wojda, 2016).

Se estudió la letalidad de una gran colección de cepas de *C. albicans* causantes de fungemia, demostrándose que existen factores propios de la cepa que la hacen más letal sobre el modelo animal. La variación en las tasas de supervivencia de las larvas infectadas con diferentes cepas permitió establecer una clasificación en cuanto a la virulencia de esta especie, en base a la habilidad invasiva de las cepas y la capacidad de escapar del sistema inmunitario de las larvas. Se clasificaron las cepas en base a su letalidad sobre el modelo de *G. mellonella*, así las cepas que tenían capacidad de matar entre el 0 – 30% de las larvas infectadas se clasificaron como poco patogénicas. Al realizar el estudio histológico de las larvas infectadas por estos aislados se observó que no produjeron invasión tisular incluso 48 horas después de la infección, así como una respuesta inmune capaz de bloquear el desarrollo de la misma. Las cepas con una letalidad entre el 31% al 70% sobre las larvas infectadas se clasificaron como cepas con moderada patogenicidad, y el estudio histológico reveló que la levadura era capaz de invadir tejidos larvarios 48 horas después de la infección, presentando una respuesta inmune que en algunos casos fue capaz de controlar la infección y evitar el desarrollo de la misma y en otros casos permitió el desarrollo de la infección ocasionando la muerte de larva. Esto sugiere que las cepas con moderada patogenicidad, en algunos casos, pueden desarrollar alta patogenicidad 72 horas después de la infección y en otros casos se mantienen con moderada patogenicidad permitiendo la supervivencia de las larvas infectadas. Esta observación requiere estudios con mayor profundidad para discernir entre aquellas cepas con capacidad de

umentar su grado de patogenicidad a lo largo de la infección. También se observó un grupo de cepas con alta capacidad patogénica, aquellas con una letalidad > al 70% 24 horas tras la infección; estas cepas eran capaces de producir biopelículas con elevada biomasa y/o actividad metabólica, lo que se relaciona con otras publicaciones que señalan que aquellas cepas capaces de producir biopelículas son más virulentas (Borghetti et al., 2014b, Cirasola et al., 2013). El estudio histológico reveló que estas cepas son capaces de invadir el tejido larvario y la respuesta inmunitaria de la larva no es eficaz para controlar el desarrollo de la infección. Existen diversos factores que influyen sobre la virulencia de una determinada cepa, lo que junto con las características propias del huésped van a marcar el curso de infección. En esta tesis se propone una clasificación que en las 24 horas posteriores al aislamiento de la cepa permitiría conocer la capacidad virulenta de una cepa dando una idea sobre el posible desarrollo de la infección. La correlación de esta característica con el pronóstico del paciente es un aspecto a considerar en el futuro.

A pesar de su baja prevalencia, el complejo de *C. guilliermondii* presenta relevancia clínica debido a su baja sensibilidad a antifúngicos. El complejo *C. guilliermondii* comprende varias especies siendo *C. guilliermondii* sensu stricto, *C. fermentati* y *C. carpophila* las principales causantes de infecciones (Vaughan-Martini et al., 2005, Lan and Xu, 2006). En estudios previos, *C. guilliermondii* sensu stricto y *C. fermentati* representaron alrededor del 95% y 4,5% de los casos respectivamente (Pfaller et al., 2006, Cheng et al., 2016). Se estudiaron 22 casos de candidemia causada por este complejo de especies y se correlacionó la virulencia con la evolución clínica de los pacientes. Se encontró una mayor frecuencia de casos causados por *C. fermentati* (22,7%) y una menor frecuencia de casos causados por *C. guilliermondii* sensu stricto (77,2%). *C. guilliermondii* se ha reportado como causa de candidemia principalmente en pacientes con tumores sólidos y neoplasias malignas hematológicas, pacientes sometidos a quimioterapia, pacientes con neutropenia, pacientes con catéteres intravasculares y vasculares, pacientes que reciben nutrición parenteral total y pacientes con exposición previa a antibióticos, corticosteroides y terapia antifúngica prolongada (principalmente fluconazol, anfotericina B y caspofungina) (Savini et al., 2011, Girmenia et al., 2006, Kabbara et al., 2008). En la serie incluida en esta tesis se encontró que los pacientes con candidemia causada por *C. guilliermondii* tenían más probabilidades de tener cáncer sólido o neoplasias malignas hematológicas y tener el origen de la candidemia en el catéter vascular (86,4%) cuando se comparó con un control histórico de pacientes con candidemia por *C. albicans*.

El complejo exhibe una sensibilidad disminuida a todos los agentes antifúngicos estudiados, con tasas de resistencia a fluconazol y otros azoles de alrededor del 10%-15% (Girmania et al., 2006, Pfaller et al., 2006, Cheng et al., 2016). Se encontró que hasta el 9% de los aislados estudiados presentaban CMI's a fluconazol por encima de los ECOFF, un porcentaje que aumentó hasta el 41% si se utilizan los puntos de corte clínico no relacionados con especies. En ausencia de puntos de corte específicos para *C. guilliermondii*, la verdadera tasa de resistencia a fluconazol permanece desconocida. Las CMI's de caspofungina, micafungina y anidulafungina frente a *C. guilliermondii* fueron, respectivamente, 4, 16 y 60 veces mayores que las CMI's de estos fármacos frente a *C. albicans* reportadas en la literatura (Marcos-Zambrano et al., 2014, Guinea et al., 2014). También se observó que caspofungina fue el fármaco más eficaz frente a las biopelículas de *C. guilliermondii*.

En cuanto al pronóstico, parece razonable esperar que la mortalidad sea alta, teniendo en cuenta las graves condiciones subyacentes de los pacientes y la baja sensibilidad antifúngica de las cepas. Sin embargo, se encontró que la mortalidad a los 7 días y 30 días fue baja y la presentación clínica fue menos severa en pacientes infectados por *C. guilliermondii* que en pacientes infectados por *C. albicans*. Esta observación concuerda con la baja virulencia de los aislados de *C. guilliermondii* en comparación con *C. albicans* en el modelo de *G. mellonella* ($P < 0,001$). Aunque este modelo se ha utilizado para estudiar la virulencia de varias especies de *Candida* (Fuchs et al., 2010b), es la primera vez que se utiliza para el estudio de la virulencia de *C. guilliermondii*. La baja virulencia de los aislamientos también puede explicarse por la limitada producción de biopelícula, ya que estudios previos demostraron que la formación de biopelícula es un factor independiente de mal pronóstico (Rajendran et al., 2016).

En este cuarto y último capítulo se demostró que el modelo infeccioso de *G. mellonella* es relativamente fácil de manejar y que permite la caracterización de cepas en base a su virulencia. La correlación entre el pronóstico favorable de los pacientes y la alta supervivencia de las larvas es alentadora y sugiere que este modelo podría ser utilizado en el laboratorio de microbiología clínica para detectar la presencia de aislados altamente virulentos.

Conclusiones



1. La identificación molecular permitió un correcto conocimiento de la epidemiología de la fungemia revelando que *C. albicans* fue la especie más prevante, y que la proporción de especies crípticas fue baja.
2. Las tasas de resistencia a equinocandinas y fluconazol fueron bajas y no pareció existir una tendencia a su aumento.
3. El “trailing” o efecto arrastre medio observado rondó el 6,8%. El efecto paradójico se observó en el 16% de las cepas analizadas. Ambos fenómenos son especie-específicos siendo *C. albicans* y *C. tropicalis* las especies donde se observaron con mayor frecuencia.
4. Existió una alta correlación entre la identificación a nivel de especie y la definición genotípica de la candidemia relacionada con el catéter, siendo esta una infección mayoritariamente monoclonal.
5. Se observaron diferencias en el número de “clústers” de *C. albicans* y *C. parapsilosis* entre hospitales sugiriendo la presencia de transmisión nosocomial. Se detectaron genotipos presentes en hospitales localizados en diferentes países, indicando la presencia de genotipos más frecuentes en el ambiente.
6. La formación de biopelícula presenta patrones especie-específicos, y el XTT y el CV son métodos complementarios para el estudio de la formación de la misma.
7. La actividad antifúngica de micafungina sobre las biopelículas de *C. albicans* depende de la actividad metabólica de las mismas, al contrario de lo que ocurre con caspofungina y anidulafungina. Micafungina fue muy activa frente a biopelículas de *C. tropicalis* mientras que anfotericina B liposomal tuvo escasa actividad.
8. Las biopelículas producidas por cepas con mutaciones en los genes *fks* fueron similares a las biopelículas de cepas salvajes. Se observó que la anfotericina B liposomal tuvo gran actividad frente a biopelículas de estas cepas con mutaciones en los genes *fks*.
9. El modelo invertebrado de *G. mellonella* permitió clasificar las cepas de *C. albicans* en base a su virulencia, demostrando diferentes grados de patogenicidad.

10. Existió una elevada correlación entre la evolución clínica de los pacientes y la virulencia en el modelo de *G. mellonella*, para el estudio de *C. guilliermondii*.

Resumen/Summary



Caracterización de levaduras causantes de fungemia: identificación y sensibilidad antifúngica, epidemiología molecular y factores de patogenicidad.

El estudio de la infección profunda causada por levaduras, en especial la fungemia, ha sido abordado históricamente bajo el análisis de los pacientes que la sufrían. Determinar los factores predisponentes de la infección, estudiar el tratamiento antifúngico más efectivo, y analizar el pronóstico de los pacientes ha sido la motivación principal del estudio en esta área de las infecciones fúngicas. Sin embargo, el estudio integral del patógeno desde diferentes puntos de vista microbiológicos, sin tener en cuenta al paciente afectado, ha recibido menos atención. Parece razonable pues que, además del paciente infectado y su manejo médico, las características propias del patógeno tengan una contribución y protagonismo especial.

Esta tesis ha pretendido estudiar las cepas causantes de fungemia en pacientes ingresados en un gran hospital de Madrid desde diferentes puntos de vista microbiológicos, algunos de ellos poco representados en la literatura médica, estructurándose en los siguientes cuatro bloques: (1) Identificación y sensibilidad a antifúngicos de levaduras causantes de fungemia, (2) Caracterización genotípica y estudio de la diversidad clonal de las principales especies de *Candida* causantes de candidemia, (3) Estudio de la formación de biopelículas de aislados de *Candida* spp. causantes de fungemia y determinación de su susceptibilidad antifúngica, y (4) Estudio de la patogenicidad de *Candida* spp. en base a la letalidad sobre un modelo de *G. mellonella*

El estudio preciso de la epidemiología de las especies causantes de fungemia es clínicamente relevante ya que permite elegir de la manera más precisa posible la terapia antifúngica empírica cuando aún no se cuenta con la identificación a nivel de especie. Esto se debe a que la especie se relaciona, con frecuencia, con un perfil de sensibilidad característico. Además, la distribución de especies causantes de fungemia muestra diferencias geográficas marcadas.

Con este primer bloque de estudios se planteó el objetivo de determinar la epidemiología de las especies causantes de fungemia en pacientes ingresados en el Hospital Gregorio Marañón mediante identificación molecular, determinar la tasa de resistencia a azoles y equinocandinas en aislados causantes de fungemia y determinar el porcentaje de cepas que presenten “trailing” a fluconazol y efecto paradójico a las equinocandinas.

Se demostró que a pesar que el número de episodios de fungemia causados por especies crípticas fue bajo, la identificación molecular proporcionó un correcto conocimiento de la epidemiología de la fungemia. Las tasas de resistencia a equinocandinas y fluconazol se mantuvieron bajas durante el periodo de estudio y no parece existir una tendencia al aumento en las mismas. Por otra parte se logró obtener una mejor comprensión de los efectos asociados al estudio *in vitro* de la sensibilidad antifúngica y se propuso una manera práctica y fácil de implementar en el laboratorio para clasificar las cepas de acuerdo al efecto arrastre “trailing” que presenten y al efecto paradójico observado.

El estudio de la identificación a nivel de especie y su sensibilidad antifúngica están fuera de duda en cepas con significación clínica. Sin embargo, este abordaje puede ser insuficiente para detectar algunos fenómenos como el origen de la candidemia, la presencia de brotes hospitalarios de infección por *Candida*, o la potencial asociación entre alguna característica fenotípica y genotipos concretos.

El diagnóstico de la candidemia relacionada con el catéter generalmente requiere el aislamiento de la misma especie de *Candida* tanto en el cultivo de la punta del catéter como en el hemocultivo, sin embargo, en ausencia de genotipado, esta definición podría ser insuficiente en aquellos casos en que los genotipos de las cepas de ambas muestras sean diferentes. En el segundo bloque de estudios presentados en esta tesis se pretendió evaluar la clonalidad de las cepas causantes de candidemia, incluida la candidemia relacionada con el catéter, producidas por las principales especies de *Candida* y estudiar la diversidad genotípica de las principales especies causantes de fungemia y su la relación con la transmisión nosocomial.

Se encontró una alta correlación entre la identificación a nivel de especie y la definición genotípica de la candidemia relacionada con el catéter, demostrándose que solo el 5% de los pacientes con esta entidad presentaban infección policlonal y que ésta fue exclusivamente causada por *C. parapsilosis*. Por otra parte se demostró que las proporciones de “clústers” de *C. albicans* y *C. parapsilosis* causantes de candidemia difieren entre hospitales, sugiriendo diferencias en la transmisión de cepas.

Una característica importante de *Candida* spp., es la formación de biopelículas, lo que explica el potencial de este microorganismo para causar candidemia relacionada con el catéter. Estudios previos han demostrado, que aquellos pacientes infectados con cepas productoras de biopelícula tienen un peor pronóstico y las especies que forman biopelículas con mayor biomasa (*C. tropicalis*) o mayor actividad

metabólica (*C. glabrata*) han sido previamente relacionadas con una evolución desfavorable en los pacientes.

Las guías actuales de manejo de la candidemia recomiendan la retirada del catéter en caso de candidemia relacionada con el catéter, ya que el pronóstico de la infección mejora una vez que se haya retirado la fuente de la misma. Sin embargo, existen casos en los que la retirada del catéter no es posible, por lo que evaluar la actividad antibiopelícula de los fármacos disponibles es necesario. Las tres equinocandinas y la anfotericina B liposomal han demostrado gran actividad *in vitro* frente a las biopelículas por lo que la retirada del catéter podría obviarse en pacientes con candidemia tratados con alguno de estos fármacos.

En el tercer bloque de esta tesis, se trató la formación de biopelículas de aislados de *Candida* spp. causantes de fungemia y el estudio de la sensibilidad antifúngica de los mismos con el objetivo de determinar la capacidad de formar biopelículas de levaduras causantes de fungemia y proponer una clasificación en base a su biomasa y su actividad metabólica, así como estudiar la sensibilidad antifúngica de las mismas.

Con los estudios incluidos en este bloque, se concluyó que existe un patrón especie-específico en cuanto a la producción de biopelículas. Micafungina fue la equinocandina más activa frente a las biopelículas de *C. albicans* y en contraste con lo observado para micafungina, la actividad antifúngica de caspofungina y anidulafungina no dependieron de la actividad metabólica o de la estructura de la biopelícula. Las cepas resistentes a equinocandinas produjeron biopelículas de acuerdo a su patrón de especies y las biopelículas de *C. tropicalis* mostraron una marcada resistencia a anfotericina B liposomal.

A parte de la formación de la biopelícula y el estudio de la sensibilidad antifúngica de la misma, existen otros aspectos que también influyen sobre la virulencia de *Candida* spp. El estudio de la letalidad de una determinada cepa sobre un modelo animal permite conocer la virulencia de la misma y estos resultados pueden correlacionarse con la evolución clínica de los pacientes infectados. En los últimos años se han empleado modelos animales novedosos, como el modelo animal invertebrado de *G. mellonella*, para el estudio de infecciones fúngicas.

En el cuarto bloque de esta tesis se planteó el objetivo de determinar la letalidad causada por cepas de *C. albicans* causantes de fungemia y crear una clasificación en base a su virulencia sobre el modelo de *G. mellonella* así como

comparar la patogenicidad de *C. guilliermondii* y *C. albicans* y su correlación con la evolución clínica de los pacientes.

Se demostró que las cepas de *C. albicans* causantes de fungemia presentaron diferente letalidad sobre el modelo de *G. mellonella* y las variaciones en las tasas de supervivencia de las larvas infectadas con diferentes cepas permitió establecer una clasificación en cuanto a la virulencia de esta especie en base a la habilidad invasiva de las cepas y la capacidad de escapar del sistema inmunitario de las larvas. En cuanto al estudio de la patogenicidad de *C. guilliermondii*, la correlación entre el pronóstico favorable de los pacientes y la alta supervivencia de las larvas es alentadora y sugiere que este modelo podría ser utilizado en el laboratorio de microbiología clínica para detectar la presencia de aislados altamente virulentos.

En resumen esta tesis esclarece ciertos aspectos carentes en la literatura acerca de la epidemiología de la candidemia, además otorga gran relevancia al estudio de la transmisión nosocomial y la presencia de factores de virulencia específicos como la producción de biopelícula y el estudio de la letalidad de las cepas sobre un modelo animal novedoso.

Characterization of yeast isolates causing fungemia: species identification and antifungal susceptibility, molecular epidemiology and virulence factors.

The study of deep-seated infections caused by yeasts, especially fungemia, has been historically done by studying the host risk factors. The determination of the predisposing factors of the infection, the study of the most effective antifungal treatment, and the analysis of the prognosis of patients has been the main motivation of research in this area.

However, the study of the pathogen from different microbiological points of view, without considering the host factors, has received less attention. It seems logical then that, together with the study of the infected patients and their medical management, the characteristics of the pathogen receive also the attention.

In this thesis strains causing fungemia in patients admitted to a large hospital in Madrid have been studied from different microbiological points of view, some of them poorly represented in the medical literature.

The project has been structured in the following four chapters: (1) Molecular identification and antifungal susceptibility testing (2) Genotypic characterization and study of the clonal diversity of the main *Candida* species causing candidemia, (3) Study of the biofilm formation of *Candida* spp. isolates causing fungemia and study of the biofilms antifungal susceptibility, and (4) Study of the virulence of *Candida* spp. on a *G. mellonella* model.

The precise study of the epidemiology of the species causing fungemia is clinically relevant since it allows establishing empirical antifungal therapy as accurate as possible when there is no identification at the species level yet, because of the well-known species and antifungal susceptibility profile.

The first chapter concerns studies aiming to determine the distribution of fungemia-causing species in patients admitted to Gregorio Marañón Hospital by means of molecular identification, and the determination of the rate of resistance to azoles and echinocandins, assessing also the percentage of strains showing fluconazole trailing and echinocandins paradoxical effect.

Although the number of episodes caused by cryptic species was low, molecular identification was required to provide a correct understanding of the fungemia epidemiology.

Resistance rates to echinocandins and fluconazole remained low during the study period and there is not an increasing trend. On the other hand, a better understanding of effects associated with the *in vitro* study of the antifungal susceptibility were done together with a proposal of a practical and easy-to-perform way to classify the strains according to the trailing and paradoxical effect.

The study of species-level identification and its antifungal susceptibility should be performed on strains with clinical significance. However, this approach may be insufficient to determine the origin of candidemia, the presence of hospital outbreaks of *Candida*, or the potential association between some phenotypic characteristic and specific genotypes.

The diagnosis of catheter-related candidemia generally requires the isolation of the same species of *Candida* in both the catheter tip and the blood cultures, however, in the absence of genotyping, this definition could be insufficient in those cases where the genotypes of the strains of both samples are different.

The second chapter aimed to evaluate the clonality of the strains causing candidemia, including catheter-related candidemia, produced by the main *Candida* species and to study the genotypic diversity of the main *Candida* species causing candidemia and the relation with nosocomial transmission.

A high correlation between species-level identification and the genotypic definition of catheter-related candidemia was found, and only 5% of patients with catheter-related candidemia had polyclonal infection exclusively caused by *C. parapsilosis*. The proportion of clusters of *C. albicans* and *C. parapsilosis* differed among hospitals, suggesting differences in the transmission of strains. Furthermore, some genotypes can be found in patients admitted to different hospitals or even in different countries.

An important feature of *Candida* spp. is the formation of biofilms what may explain its potential to cause catheter-related candidemia. Previous studies have shown that those patients infected with biofilm-forming strains have a poorer prognosis, moreover those patients infected with species with biofilms with higher biomass (*C. tropicalis*) or higher metabolic activity (*C. glabrata*) showed a worse outcome.

Current guidelines for the management of candidemia recommend withdrawal of the catheter in cases of catheter-related candidemia, as the prognosis of infection improves once the source has been removed. The three echinocandins and liposomal amphotericin B have shown high *in vitro* activity against biofilms and catheter removal could be avoided in patients with candidemia treated with these drugs.

The third chapter aimed to know the ability of yeasts causing fungemia to form biofilms and propose a classification based on their biomass and their metabolic activity, we also aimed to study the antifungal susceptibility of the biofilms formed.

There was a species-specific pattern in biofilm production. Micafungin was the most active echinocandin against *C. albicans* biofilms, and in contrast to that observed for micafungin, the antifungal activity of caspofungin and anidulafungin was not dependent on the metabolic activity or structure of the biofilm. Echinocandin resistant strains formed biofilms according to their species pattern and *C. tropicalis* biofilms showed marked resistance to liposomal amphotericin B.

Besides the biofilm formation and the study of antifungal susceptibility, there are other aspects that also might influence the virulence of *Candida* spp. The study of the lethality of a particular strain on an animal model allows knowing the virulence of the strain and these results can be correlated with the clinical outcome of the patients. In recent years, novel animal models have been used for the study of fungal infections such as the invertebrate animal model of *G. mellonella*.

Chapter four aimed to determine the lethality caused by *C. albicans* strains causing fungemia and propose a classification based on their virulence. The virulence of *C. guilliermondii* and *C. albicans* were compared and their relation with the clinical outcome of the patients was assessed.

C. albicans isolates causing fungemia showed different ability to kill *G. mellonella* larvae, and variations in the survival rates of larvae infected with different strains allowed establishing a classification based on the virulence and the ability to invasive tissues or to escape to the larvae immune system. The correlation between the favorable prognosis of the patients and the high survival of the larvae is encouraging and suggests that this model could be used in the clinical microbiology laboratory to detect the presence of highly virulent isolates.

In summary, this thesis clarifies certain aspects lacking in the literature on the epidemiology of candidemia, also gives relevance to the study of nosocomial transmission and the presence of specific virulence factors such as biofilm production and the study of the lethality of strains on a novel animal model.



Referencias Bibliográficas

- 2008a. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*, 14, 398-405.
- 2008b. EUCAST Technical Note on voriconazole. *Clin Microbiol Infect*, 14, 985-7.
- ABBES, S., SELLAMI, H., SELLAMI, A., MAKNI, F., MAHFOUDH, N., MAKNI, H., KHALED, S. & AYADI, A. 2011. Microsatellite analysis and susceptibility to FCZ of *Candida glabrata* invasive isolates in Sfax Hospital, Tunisia. *Med Mycol*, 49, 10-5.
- AGRAWAL, D., PATTERSON, T. F., RINALDI, M. G. & REVANKAR, S. G. 2007. Trailing end-point phenotype of *Candida* spp. in antifungal susceptibility testing to fluconazole is eliminated by altering incubation temperature. *J Med Microbiol*, 56, 1003-4.
- AL-FATTANI, M. A. & DOUGLAS, L. J. 2006. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*, 55, 999-1008.
- ALAM, M. Z., ALAM, Q., JIMAN-FATANI, A., KAMAL, M. A., ABUZENADAH, A. M., CHAUDHARY, A. G., AKRAM, M. & HAQUE, A. 2014. *Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. *World J Microbiol Biotechnol*, 30, 1437-51.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., ALCAZAR-FUOLI, L. & CUENCA-ESTRELLA, M. 2014. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathologia*, 178, 427-33.
- ALCOBA-FLOREZ, J., MENDEZ-ALVAREZ, S., CANO, J., GUARRO, J., PEREZ-ROTH, E. & DEL PILAR AREVALO, M. 2005. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol*, 43, 4107-11.
- ALEXANDER, B. D., JOHNSON, M. D., PFEIFFER, C. D., JIMENEZ-ORTIGOSA, C., CATANIA, J., BOOKER, R., CASTANHEIRA, M., MESSER, S. A., PERLIN, D. S. & PFALLER, M. A. 2013. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: Clinical Failure Correlates With Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. *Clin Infect Dis*.12, 1724-32.
- ALMIRANTE, B., RODRIGUEZ, D., PARK, B. J., CUENCA-ESTRELLA, M., PLANES, A. M., ALMELA, M., MENSA, J., SANCHEZ, F., AYATS, J., GIMENEZ, M., SABALLS, P., FRIDKIN, S. K., MORGAN, J., RODRIGUEZ-TUDELA, J. L., WARNOCK, D. W. & PAHISSA, A. 2005. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*, 43, 1829-35.

- ALNUAIMI, A. D., O'BRIEN-SIMPSON, N. M., REYNOLDS, E. C. & MCCULLOUGH, M. J. 2013. Clinical isolates and laboratory reference *Candida* species and strains have varying abilities to form biofilms. *FEMS* 13, 689-99.
- ALTMAN, F. P. 1976. Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem*, 9, 1-56.
- ALVAREZ, G., GONZALEZ, M., ISABAL, S., BLANC, V. & LEON, R. 2013. Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. *AMB Express*, 3, 1.
- ALLER, A. I., MARTIN-MAZUELOS, E., LOZANO, F., GOMEZ-MATEOS, J., STEELE-MOORE, L., HOLLOWAY, W. J., GUTIERREZ, M. J., RECIO, F. J. & ESPINEL-INGROFF, A. 2000. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 1544-8.
- AMOURI, I., SELLAMI, H., ABBES, S., HADRICH, I., MAHFOUDH, N., MAKNI, H. & AYADI, A. 2012. Microsatellite analysis of *Candida* isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Med Microbiol*, 61, 1091-6.
- ANAISSE, E. J., REX, J. H., UZUN, O. & VARTIVARIAN, S. 1998. Predictors of adverse outcome in cancer patients with candidemia. *Am J Med*, 104, 238-45.
- ARENDRUP, M. C., BRUUN, B., CHRISTENSEN, J. J., FUURSTED, K., JOHANSEN, H. K., KJAELDGAARD, P., KNUDSEN, J. D., KRISTENSEN, L., MOLLER, J., NIELSEN, L., ROSENVINGE, F. S., RODER, B., SCHONHEYDER, H. C., THOMSEN, M. K. & TRUBERG, K. 2011a. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J Clin Microbiol*, 49, 325-34.
- ARENDRUP, M. C., CUENCA-ESTRELLA, M., DONNELLY, J. P., HOPE, W., LASS-FLORL, C. & RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. 2011b. EUCAST technical note on posaconazole. *Clin Microbiol Infect*, 17, E16-7.
- ARENDRUP, M. C., CUENCA-ESTRELLA, M., LASS-FLORL, C. & HOPE, W. 2012a. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect*, 18, E246-7.
- ARENDRUP, M. C., CUENCA-ESTRELLA, M., LASS-FLORL, C. & HOPE, W. W. 2014a. Breakpoints for antifungal agents: An update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp. and triazoles against *Aspergillus* spp. *Drug Resist Updat*. 16, 81-5.
- ARENDRUP, M. C., CUENCA-ESTRELLA, M., LASS-FLORL, C. & HOPE, W. W. 2014b. EUCAST technical note on *Candida* and micafungin, anidulafungin and fluconazole. *Mycoses*, 57, 377-9.

- ARENDRUP, M. C., FUURSTED, K., GAHRN-HANSEN, B., JENSEN, I. M., KNUDSEN, J. D., LUNDGREN, B., SCHONHEYDER, H. C. & TVEDE, M. 2005. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol*, 43, 4434-40.
- ARENDRUP, M. C., KAHLMETER, G., RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. & DONNELLY, J. P. 2009. Breakpoints for susceptibility testing should not divide wild-type distributions of important target species. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 1628-9.
- ARENDRUP, M. C., PERLIN, D. S., JENSEN, R. H., HOWARD, S. J., GOODWIN, J. & HOPE, W. 2012b. Differential *in vivo* activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata* isolates with and without *FKS* resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 2435-42.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A., WARNOCK, D. W. & MORRISON, C. J. 2000. Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between *in vitro* antifungal susceptibility test results and *in vivo* outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 2081-5.
- ASMUNDSOTTIR, L. R., ERLENDSDOTTIR, H. & GOTTFREDSSON, M. 2012. Nationwide study of candidemia, antifungal use and antifungal drug resistance in Iceland, 2000-2011. *J Clin Microbiol*. 51, 841-8
- ASMUNDSOTTIR, L. R., ERLENDSDOTTIR, H., HARALDSSON, G., GUO, H., XU, J. & GOTTFREDSSON, M. 2008. Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. *Clin Infect Dis*, 47, e17-24.
- AVNI, T., LEIBOVICI, L. & PAUL, M. 2011. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*, 49, 665-70.
- AZEREDO, J., AZEVEDO, N. F., BRIANDET, R., CERCA, N., COENYE, T., COSTA, A. R., DESVAUX, M., DI BONAVENTURA, G., HEBRAUD, M., JAGLIC, Z., KACANIOVA, M., KNOCHEL, S., LOURENCO, A., MERGULHAO, F., MEYER, R. L., NYCHAS, G., SIMOES, M., TRESSE, O. & STERNBERG, C. 2016. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*, 1-39.
- BADER, O., WEIG, M., TAVERNE-GHADWAL, L., LUGERT, R., GROSS, U. & KUHNS, M. 2011. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*, 17, 1359-65.
- BAQUERO, F. & COQUE, T. M. 2011. Multilevel population genetics in antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 35, 705-6.

- BARCHIESI, F., CAGGIANO, G., FALCONI DI FRANCESCO, L., MONTAGNA, M. T., BARBUTI, S. & SCALISE, G. 2004. Outbreak of fungemia due to *Candida parapsilosis* in a pediatric oncology unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 49, 269-71.
- BETTS, R. F., NUCCI, M., TALWAR, D., GARECA, M., QUEIROZ-TELLES, F., BEDIMO, R. J., HERBRECHT, R., RUIZ-PALACIOS, G., YOUNG, J. A., BADDLEY, J. W., STROHMAIER, K. M., TUCKER, K. A., TAYLOR, A. F. & KARTSONIS, N. A. 2009. A Multicenter, double-blind trial of a high-dose caspofungin treatment regimen versus a standard caspofungin treatment regimen for adult patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*, 48, 1676-84.
- BINDER, U., MAURER, E. & LASS-FLORL, C. 2016. *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. *Fungal Biol*, 120, 288-95.
- BIZERRA, F. C., NAKAMURA, C. V., DE POERSCH, C., ESTIVALET SVIDZINSKI, T. I., BORSATO QUESADA, R. M., GOLDENBERG, S., KRIEGER, M. A. & YAMADA-OGATTA, S. F. 2008. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*, 8, 442-50.
- BLISS, J. M., BASAVEGOWDA, K. P., WATSON, W. J., SHEIKH, A. U. & RYAN, R. M. 2008. Vertical and horizontal transmission of *Candida albicans* in very low birth weight infants using DNA fingerprinting techniques. *Pediatr Infect Dis J*, 27, 231-5.
- BORGHI, E., ANDREONI, S., CIRASOLA, D., RICUCCI, V., SCIOTA, R. & MORACE, G. 2014a. Antifungal resistance does not necessarily affect *Candida glabrata* fitness. *J Chemother*, 26, 32-6.
- BORGHI, E., ROMAGNOLI, S., FUCHS, B. B., CIRASOLA, D., PERDONI, F., TOSI, D., BRAIDOTTI, P., BULFAMANTE, G., MORACE, G. & MYLONAKIS, E. 2014b. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. *Future Microbiol*, 9, 163-73.
- BOTTEREL, F., DESTERKE, C., COSTA, C. & BRETAGNE, S. 2001. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J Clin Microbiol*, 39, 4076-81.
- BRENNAN, M., THOMAS, D. Y., WHITEWAY, M. & KAVANAGH, K. 2002. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 34, 153-7.
- BRILLOWSKA-DABROWSKA, A., SCHON, T., PANNANUSORN, S., LONNBRO, N., BERNHOFF, L., BONNEDAL, J., HAGGSTROM, J., WISTEDT, A., FERNANDEZ, V. & ARENDRUP, M. C. 2009. A nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* in southern Sweden verified by genotyping. *Scand J Infect Dis*, 41, 135-42.
- CAMPOY, S. & ADRIO, J. L. 2016. Antifungals. *Biochem Pharmacol*.

- CANTON, E., ESPINEL-INGROFF, A. & PEMAN, J. 2009. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7, 107-19.
- CASTELLI, M. V., BUTASSI, E., MONTEIRO, M. C., SVETAZ, L. A., VICENTE, F. & ZACCHINO, S. A. 2014. Novel antifungal agents: a patent review (2011 - present). *Expert Opin Ther Pat*, 24, 323-38.
- CERCENADO, E., ENA, J., RODRIGUEZ-CREIXEMS, M., ROMERO, I. & BOUZA, E. 1990. A conservative procedure for the diagnosis of catheter-related infections. *Arch Intern Med*, 150, 1417-20.
- CERVERA, C. 2012. [Candidemia and invasive candidiasis in the adult: clinical forms and treatment]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 30, 483-91.
- CIRASOLA, D., SCIOTA, R., VIZZINI, L., RICUCCI, V., MORACE, G. & BORGHI, E. 2013. Experimental biofilm-related *Candida* infections. *Future Microbiol*, 8, 799-805.
- CLANCY, C. J. & NGUYEN, M. H. 2013. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis*, 56, 1284-92.
- CLEVELAND, A. A., HARRISON, L. H., FARLEY, M. M., HOLLICK, R., STEIN, B., CHILLER, T. M., LOCKHART, S. R. & PARK, B. J. 2015. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. *PLoS One*, 10, e0120452.
- CLSI (ed.) 2008. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: Approved standard M27-A3*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. .
- COLOMBO, A. L., MELO, A. S., CRESPO ROSAS, R. F., SALOMAO, R., BRIONES, M., HOLLIS, R. J., MESSER, S. A. & PFALLER, M. A. 2003. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 46, 253-7.
- CORNELY, O. A., BASSETTI, M., CALANDRA, T., GARBINO, J., KULLBERG, B. J., LORTHOLARY, O., MEERSSEMAN, W., AKOVA, M., ARENDRUP, M. C., ARIKAN-AKDAGLI, S., BILLE, J., CASTAGNOLA, E., CUENCA-ESTRELLA, M., DONNELLY, J. P., GROLL, A. H., HERBRECHT, R., HOPE, W. W., JENSEN, H. E., LASS-FLORL, C., PETRIKKOS, G., RICHARDSON, M. D., ROILIDES, E., VERWEIJ, P. E., VISCOLI, C. & ULLMANN, A. J. 2012. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect*, 18 Suppl 7, 19-37.

- CORREIA, A., SAMPAIO, P., JAMES, S. & PAIS, C. 2006. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 313-7.
- CRISEO, G., SCORDINO, F. & ROMEO, O. 2015. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *J Microbiol Methods*, 111, 50-6.
- CUENCA-ESTRELLA, M. & RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. 2010. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8, 267-76.
- CHAMILOS, G., LEWIS, R. E., ALBERT, N. & KONTOYIANNIS, D. P. 2007. Paradoxical effect of Echinocandins across *Candida* species in vitro: evidence for echinocandin-specific and candida species-related differences. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 2257-9.
- CHARLES, P. E., DALLE, F., AUBE, H., DOISE, J. M., QUENOT, J. P., AHO, L. S., CHAVANET, P. & BLETTERY, B. 2005. *Candida* spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. *Intensive Care Med*, 31, 393-400.
- CHENG, J. W., YU, S. Y., XIAO, M., WANG, H., KUDINHA, T., KONG, F. & XU, Y. C. 2016. Identification and Antifungal Susceptibility Profile of *Candida guilliermondii* and *Candida fermentati* from a Multicenter Study in China. *J Clin Microbiol*, 54, 2187-9.
- CHOWDHARY, A., BECKER, K., FEGELER, W., GUGNANI, H. C., KAPOOR, L., RANDHAWA, V. S. & MEHTA, G. 2003. An outbreak of candidemia due to *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit. *Mycoses*, 46, 287-92.
- CHRYSSANTHOU, E. & CUENCA-ESTRELLA, M. 2002. Comparison of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. *J Clin Microbiol*, 40, 3841-4.
- DA SILVA RUIZ, L., MONTELLI, A. C., SUGIZAKI, M. D., GONCALVES DA SILVA, E., MATUURA DE BATISTA, G. C., MOREIRA, D. & RODRIGUES PAULA, C. 2012. Outbreak of fungemia caused by *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: Molecular investigation through microsatellite analysis. *Rev Iberoam Micol*. 30, 112-5.
- DANNAOUI, E., PAUGAM, A., DEVELOUX, M., CHOCHILLON, C., MATHERON, J., DATRY, A., BOUGES-MICHEL, C., BONNAL, C., DROMER, F. & BRETAGNE, S. 2010. Comparison of antifungal MICs for yeasts obtained using the EUCAST method in a reference laboratory and the Etest in nine different hospital laboratories. *Clin Microbiol Infect*, 16, 863-9.
- DENNING, D. W. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*, 362, 1142-51.

- DESNOS-OLLIVIER, M., BRETAGNE, S., RAOUX, D., HOINARD, D., DROMER, F. & DANNAOUI, E. 2008. Mutations in the *fks1* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 3092-8.
- DIAB-ELSCHAHAWI, M., FORSTNER, C., HAGEN, F., MEIS, J. F., LASSNIG, A. M., PRESTERL, E. & KLAASSEN, C. H. 2012. Microsatellite genotyping clarified conspicuous accumulation of *Candida parapsilosis* at a cardiothoracic surgery intensive care unit. *J Clin Microbiol*, 50, 3422-6.
- DIEKEMA, D., ARBEFEVILLE, S., BOYKEN, L., KROEGER, J. & PFALLER, M. 2012. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73, 45-8.
- DIZBAY, M., KALKANCI, A., SEZER, B. E., AKTAS, F., AYDOGAN, S., FIDAN, I., KUSTIMUR, S. & SUGITA, T. 2008. Molecular investigation of a fungemia outbreak due to *Candida parapsilosis* in an intensive care unit. *Braz J Infect Dis*, 12, 395-9.
- DOI, A. M., PIGNATARI, A. C., EDMOND, M. B., MARRA, A. R., CAMARGO, L. F., SIQUEIRA, R. A., DA MOTA, V. P. & COLOMBO, A. L. 2016. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS One*, 11, e0146909.
- DORNELAS-RIBEIRO, M., PINHEIRO, E. O., GUERRA, C., BRAGA-SILVA, L. A., CARVALHO, S. M., SANTOS, A. L., ROZENTAL, S. & FRACALANZZA, S. E. 2012. Cellular characterisation of *Candida tropicalis* presenting fluconazole-related trailing growth. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107, 31-8.
- DOUGLAS, L. J. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*, 11, 30-6.
- DUCEL, G., FABRY, J, NICOLLE, L, WORLD HEALTH ORGANIZATION. DEPT. OF EPIDEMIC AND PANDEMIC ALERT AND RESPONSE 2002. *Prevención de las infecciones nosocomiales : guía práctica*.
- DUPONT, B. 2002. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother*, 49 Suppl 1, 31-6.
- DURAN-VALLE, M. T., GAGO, S., GOMEZ-LOPEZ, A., CUENCA-ESTRELLA, M., JIMENEZ DIEZ-CANSECO, L., GOMEZ-GARCES, J. L. & ZARAGOZA, O. 2012. Recurrent episodes of candidemia due to *Candida glabrata* with a mutation in hot spot 1 of the *FKS2* gene developed after prolonged therapy with caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 3417-9.
- ELOY, O., MARQUE, S., BOTTEREL, F., STEPHAN, F., COSTA, J. M., LASSERRE, V. & BRETAGNE, S. 2006. Uniform distribution of three *Candida albicans* microsatellite

markers in two French ICU populations supports a lack of nosocomial cross-contamination. *BMC Infect Dis*, 6, 162.

ESCRIBANO, P., MARCOS-ZAMBRANO, L. J., RECIO, S., RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M., MUÑOZ, P., BOUZA, E. & GUINEA, J. 2013a. Genotypic Analysis of *Candida parapsilosis* Isolates Causing Fungemia: Evidence of Endemic Genotypes in the Hospital 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, abstract (R-2708).

ESCRIBANO, P., RODRIGUEZ-CREIXEMS, M., SANCHEZ-CARRILLO, C., MUNOZ, P., BOUZA, E. & GUINEA, J. 2013b. Endemic genotypes of *Candida albicans* causing fungemia are frequent in the hospital. *J Clin Microbiol*, 51, 2118-23.

ESCHENAUER, G. A. & CARVER, P. L. 2013. The evolving role of antifungal susceptibility testing. *Pharmacotherapy*, 33, 465-75.

ESPINEL-INGROFF, A., ARENDRUP, M. C., PFALLER, M. A., BONFIETTI, L. X., BUSTAMANTE, B., CANTON, E., CHRYSANTHOU, E., CUENCA-ESTRELLA, M., DANNAOUI, E., FOTHERGILL, A., FULLER, J., GAUSTAD, P., GONZALEZ, G. M., GUARRO, J., LASS-FLORL, C., LOCKHART, S. R., MEIS, J. F., MOORE, C. B., OSTROSKY-ZEICHNER, L., PELAEZ, T., PUKINSKAS, S. R., ST-GERMAIN, G., SZESZS, M. W. & TURNIDGE, J. 2013. Interlaboratory variability of Caspofungin MICs for *Candida* spp. Using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent? *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 5836-42.

FANNING, S. & MITCHELL, A. P. 2012. Fungal biofilms. *PLoS pathogens*, 8, e1002585.

FARIA-RAMOS, I., NEVES-MAIA, J., RICARDO, E., SANTOS-ANTUNES, J., SILVA, A. T., COSTA-DE-OLIVEIRA, S., CANTON, E., RODRIGUES, A. G. & PINA-VAZ, C. 2014. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during a Portuguese multicenter survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33, 2241-7.

FERNANDES, T., SILVA, S. & HENRIQUES, M. 2015. *Candida tropicalis* biofilm's matrix--involvement on its resistance to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 83, 165-9.

FERNANDEZ-RUIZ, M., AGUADO, J. M., ALMIRANTE, B., LORA-PABLOS, D., PADILLA, B., PUIG-ASENSIO, M., MONTEJO, M., GARCIA-RODRIGUEZ, J., PEMAN, J., RUIZ PEREZ DE PIPAON, M. & CUENCA-ESTRELLA, M. 2014. Initial use of echinocandins does not negatively influence outcome in *Candida parapsilosis* bloodstream infection: a propensity score analysis. *Clin Infect Dis*, 58, 1413-21.

FERNANDEZ-SILVA, F., LACKNER, M., CAPILLA, J., MAYAYO, E., SUTTON, D., CASTANHEIRA, M., FOTHERGILL, A. W., LASS-FLORL, C. & GUARRO, J. 2014. *In*

- in vitro* antifungal susceptibility of *Candida glabrata* to caspofungin and the presence of FKS mutations correlate with treatment response in an immunocompromised murine model of invasive infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 3646-9.
- FERREIRA, A. V., PRADO, C. G., CARVALHO, R. R., DIAS, K. S. & DIAS, A. L. 2013. *Candida albicans* and non-*C. albicans Candida* species: comparison of biofilm production and metabolic activity in biofilms, and putative virulence properties of isolates from hospital environments and infections. *Mycopathologia*, 175, 265-72.
- FERRER, C. & ALMIRANTE, B. 2014. [Venous catheter-related infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 32, 115-24.
- FIORI, B., POSTERARO, B., TORELLI, R., TUMBARELLO, M., PERLIN, D. S., FADDA, G. & SANGUINETTI, M. 2011. *In vitro* activities of anidulafungin and other antifungal agents against biofilms formed by clinical isolates of different *Candida* and *Aspergillus* species. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3031-5.
- FIRON, A., LESAGE, G. & BUSSEY, H. 2004. Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. *Curr Opin Microbiol*, 7, 617-23.
- FOULET, F., NICOLAS, N., ELOY, O., BOTTEREL, F., GANTIER, J. C., COSTA, J. M. & BRETAGNE, S. 2005. Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*, 43, 4574-9.
- FRENKEL, M., MANDELBLAT, M., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., MENDLOVIC, S., SEMIS, R. & SEGAL, E. 2016. Pathogenicity of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal candidiasis assessed in mice and *Galleria mellonella*. *J Mycol Med*, 26, 1-8.
- FRIDKIN, S. K. 2005. Candidemia is costly-plain and simple. *Clin Infect Dis*, 41, 1240-1.
- FRIEDMAN, N. D., KAYE, K. S., STOUT, J. E., MCGARRY, S. A., TRIVETTE, S. L., BRIGGS, J. P., LAMM, W., CLARK, C., MACFARQUHAR, J., WALTON, A. L., RELLER, L. B. & SEXTON, D. J. 2002. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med*, 137, 791-7.
- FUCHS, B. B., EBY, J., NOBILE, C. J., EL KHOURY, J. B., MITCHELL, A. P. & MYLONAKIS, E. 2010a. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes Infect*, 12, 488-96.
- FUCHS, B. B., O'BRIEN, E., KHOURY, J. B. & MYLONAKIS, E. 2010b. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*, 1, 475-82.
- GAGO, S., GARCIA-RODAS, R., CUESTA, I., MELLADO, E. & ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. 2014. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida*

- metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence*, 5, 278-85.
- GARCIA-EFFRON, G., KATIYAR, S. K., PARK, S., EDLIND, T. D. & PERLIN, D. S. 2008. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in *Fks1p* in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2305-12.
- GARCIA-EFFRON, G., LEE, S., PARK, S., CLEARY, J. D. & PERLIN, D. S. 2009a. Effect of *Candida glabrata* *FKS1* and *FKS2* mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 3690-9.
- GARCIA-EFFRON, G., PARK, S. & PERLIN, D. S. 2009b. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of *fks1* mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 112-22.
- GAUDIE, C. M., WRAGG, P. N. & BARBER, A. M. 2009. Outbreak of disease due to *Candida krusei* in a small dairy herd in the UK. *Vet Rec*, 165, 535-7.
- GIRMENIA, C., PIZZARELLI, G., CRISTINI, F., BARCHIESI, F., SPREGHINI, E., SCALISE, G. & MARTINO, P. 2006. *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol*, 44, 2458-64.
- GOLDSTEIN, B., GIROIR, B. & RANDOLPH, A. 2005. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*, 6, 2-8.
- GUDUCUOGLU, H., GULTEPE, B., OTLU, B., BEKTAS, A., YILDIRIM, O., TUNCER, O. & BERKTAS, M. 2016. *Candida albicans* outbreak associated with total parenteral nutrition in the neonatal unit. *Indian J Med Microbiol*, 34, 202-7.
- GUINEA, J. 2014. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect*, 20 Suppl 6, 5-10.
- GUINEA, J., PELAEZ, T., ALCALA, L. & BOUZA, E. 2007. Correlation between the E test and the CLSI M-38 A microdilution method to determine the activity of amphotericin B, voriconazole, and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Diag Microbiol Infect Dis*, 57, 273-6.
- GUINEA, J., ZARAGOZA, O., ESCRIBANO, P., MARTIN-MAZUELOS, E., PEMAN, J., SANCHEZ-REUS, F. & CUENCA-ESTRELLA, M. 2014. Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 58, 1529-37.

- HARRIS, D. M. & HATA, D. J. 2013. Rapid identification of bacteria and *Candida* using pna-fish from blood and peritoneal fluid cultures: a retrospective clinical study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 12, 2.
- HASAN, F., XESS, I., WANG, X., JAIN, N. & FRIES, B. C. 2009. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect*, 11, 753-61.
- HEALEY, K. R., ZHAO, Y., PEREZ, W. B., LOCKHART, S. R., SOBEL, J. D., FARMAKIOTIS, D., KONTOYIANNIS, D. P., SANGLARD, D., TAJ-ALDEEN, S. J., ALEXANDER, B. D., JIMENEZ-ORTIGOSA, C., SHOR, E. & PERLIN, D. S. 2016. Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance. *Nat Commun*, 7, 11128.
- HERNANDEZ-CASTRO, R., ARROYO-ESCALANTE, S., CARRILLO-CASAS, E. M., MONCADA-BARRON, D., ALVAREZ-VERONA, E., HERNANDEZ-DELGADO, L., TORRES-NARVAEZ, P. & LAVALLE-VILLALOBOS, A. 2010. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *Eur J Pediatr*, 169, 783-7.
- HOFES, S., MOGAVERO, S. & HUBE, B. 2016. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J Microbiol*, 54, 149-69.
- HOLMES, A., ALLISON, L., WARD, M., DALLMAN, T. J., CLARK, R., FAWKES, A., MURPHY, L. & HANSON, M. 2015. Utility of Whole-Genome Sequencing of *Escherichia coli* O157 for Outbreak Detection and Epidemiological Surveillance. *J Clin Microbiol*, 53, 3565-73.
- HUANG, A. M., NEWTON, D., KUNAPULI, A., GANDHI, T. N., WASHER, L. L., ISIP, J., COLLINS, C. D. & NAGEL, J. L. 2013. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis*, 57, 1237-45.
- JACOBSEN, I. D. 2014. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence*, 5, 237-9.
- JACOBSEN, I. D., LUTTICH, A., KURZAI, O., HUBE, B. & BROCK, M. 2014. *In vivo* imaging of disseminated murine *Candida albicans* infection reveals unexpected host sites of fungal persistence during antifungal therapy. *J Antimicrob Chemother*, 69, 2785-96.
- KABBARA, N., LACROIX, C., PEFFAULT DE LATOUR, R., SOCIE, G., GHANNOUM, M. & RIBAUD, P. 2008. Breakthrough *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving long-term caspofungin therapy. *Haematologica*, 93, 639-40.

- KAHLMETER, G., BROWN, D. F., GOLDSTEIN, F. W., MACGOWAN, A. P., MOUTON, J. W., OSTERLUND, A., RODLOFF, A., STEINBAKK, M., URBASKOVA, P. & VATOPOULOS, A. 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 52, 145-8.
- KATRAGKOU, A., CHATZIMOSCHOU, A., SIMITSOPOULOU, M., DALAKIOURIDOU, M., DIZA-MATAFTSI, E., TSANTALI, C. & ROILIDES, E. 2008. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 357-60.
- KHAN, Z. U., AL-SWEIH, N. A., AHMAD, S., AL-KAZEMI, N., KHAN, S., JOSEPH, L. & CHANDY, R. 2007. Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. *J Clin Microbiol*, 45, 2025-7.
- KITE, P., DOBBINS, B. M., WILCOX, M. H. & MCMAHON, M. J. 1999. Rapid diagnosis of central-venous-catheter-related bloodstream infection without catheter removal. *Lancet*, 354, 1504-7.
- KLEVAY, M. J., ERNST, E. J., HOLLANBAUGH, J. L., MILLER, J. G., PFALLER, M. A. & DIEKEMA, D. J. 2008. Therapy and outcome of *Candida glabrata* versus *Candida albicans* bloodstream infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 60, 273-7.
- KNETSCH, C. W., CONNOR, T. R., MUTREJA, A., VAN DORP, S. M., SANDERS, I. M., BROWNE, H. P., HARRIS, D., LIPMAN, L., KEESSEN, E. C., CORVER, J., KUIJPER, E. J. & LAWLEY, T. D. 2014. Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. *Euro Surveill*, 19, 20954.
- KUHN, D. M., GEORGE, T., CHANDRA, J., MUKHERJEE, P. K. & GHANNOUM, M. A. 2002. Antifungal susceptibility of *Candida biofilms*: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 1773-80.
- L'OLLIVIER, C., LABRUERE, C., JEBRANE, A., BOUGNOUX, M. E., D'ENFERT, C., BONNIN, A. & DALLE, F. 2012. Using a Multi-Locus Microsatellite Typing method improved phylogenetic distribution of *Candida albicans* isolates but failed to demonstrate association of some genotype with the commensal or clinical origin of the isolates. *Infect Genet Evol*, 12, 1949-57.
- LACKNER, M., TSCHERNER, M., SCHALLER, M., KUCHLER, K., MAIR, C., SARTORI, B., ISTELE, F., ARENDRUP, M. C. & LASS-FLORL, C. 2014. Positions and numbers of *FKS* mutations in *Candida albicans* selectively influence *in vitro* and *in vivo* susceptibilities to echinocandin treatment. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 3626-35.
- LACROIX, C., GICQUEL, A., SENDID, B., MEYER, J., ACCOCEBERRY, I., FRANCOIS, N., MORIO, F., DESOUBEAUX, G., CHANDENIER, J., KAUFFMANN-

- LACROIX, C., HENNEQUIN, C., GUITARD, J., NASSIF, X. & BOUGNOUX, M. E. 2014. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect*, 20, 153-8.
- LAN, L. & XU, J. 2006. Multiple gene genealogical analyses suggest divergence and recent clonal dispersal in the opportunistic human pathogen *Candida guilliermondii*. *Microbiology*, 152, 1539-49.
- LASHERAS, A., ROGUES, A. M., PEYRERE, S., BOULARD, G., BEBEAR, C. M., GACHIE, J. P., BRETAGNE, S. & DROMER, F. 2007. *Candida albicans* outbreak in a neurosurgical intensive care unit. *J Hosp Infect*, 65, 181-2.
- LEE, I., MORALES, K. H., ZAOUTIS, T. E., FISHMAN, N. O., NACHAMKIN, I. & LAUTENBACH, E. 2010. Clinical and economic outcomes of decreased fluconazole susceptibility in patients with *Candida glabrata* bloodstream infections. *Am J Infect Control*, 38, 740-5.
- LEE, M. K., KIM, H. R., KANG, J. O., KIM, M. N., KIM, E. C., KIM, J. S., KIM, J. J., PARK, Y. J., SONG, W., SHIN, J. H., LEE, K. M., LEE, N. Y., LEE, M., LEE, W. G., LEE, C. K., LEE, H. J., CHANG, C. L. & CHOI, T. Y. 2007. Susceptibility and trailing growth of *Candida albicans* to fluconazole: results of a Korean multicentre study. *Mycoses*, 50, 148-9.
- LEE, M. K., WILLIAMS, L. E., WARNOCK, D. W. & ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. 2004. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J Antimicrob Chemother*, 53, 217-24.
- LENARDON, M. D. & NANTEL, A. 2012. Rapid detection of aneuploidy following the generation of mutants in *Candida albicans*. *Methods Mol Biol*, 845, 41-9.
- LEROY, O., GANGNEUX, J. P., MONTRAVERS, P., MIRA, J. P., GOUIN, F., SOLLET, J. P., CARLET, J., REYNES, J., ROSENHEIM, M., REGNIER, B. & LORTHOLARY, O. 2009. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med*, 37, 1612-8.
- LEVIN, A. S., COSTA, S. F., MUSSI, N. S., BASSO, M., SINTO, S. I., MACHADO, C., GEIGER, D. C., VILLARES, M. C., SCHREIBER, A. Z., BARONE, A. A. & BRANCHINI, M. L. 1998. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 30, 243-9.
- LEVY, M. M., FINK, M. P., MARSHALL, J. C., ABRAHAM, E., ANGUS, D., COOK, D., COHEN, J., OPAL, S. M., VINCENT, J. L. & RAMSAY, G. 2003. 2001

- SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*, 31, 1250-6.
- LI, D. D., DENG, L., HU, G. H., ZHAO, L. X., HU, D. D., JIANG, Y. Y. & WANG, Y. 2013. Using *Galleria mellonella-Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biol Pharm Bull*, 36, 1482-7.
- LIN, H. C., LIN, H. Y., SU, B. H., HO, M. W., HO, C. M., LEE, C. Y., LIN, M. H., HSIEH, H. Y., LI, T. C., HWANG, K. P. & LU, J. J. 2012. Reporting an outbreak of *Candida pelliculosa* fungemia in a neonatal intensive care unit. *J Microbiol Immunol Infect*.
- LOCKHART, S. R., ETIENNE, K. A., VALLABHANENI, S., FAROOQI, J., CHOWDHARY, A., GOVENDER, N. P., COLOMBO, A. L., CALVO, B., CUOMO, C. A., DESJARDINS, C. A., BERKOW, E. L., CASTANHEIRA, M., MAGOBO, R. E., JABEEN, K., ASGHAR, R. J., MEIS, J. F., JACKSON, B., CHILLER, T. & LITVINTSEVA, A. P. 2017. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin Infect Dis*, 64, 134-140.
- MAGANTI, H., YAMAMURA, D. & XU, J. 2011. Prevalent nosocomial clusters among causative agents for candidemia in Hamilton, Canada. *Med Mycol*, 49, 530-8.
- MAKI, D. G., WEISE, C. E. & SARAFIN, H. W. 1977. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med*, 296, 1305-9.
- MANZONI, P., MOSTERT, M., JACQZ-AIGRAIN, E., STRONATI, M. & FARINA, D. 2012. *Candida* colonization in the nursery. *J Pediatr (Rio J)*, 88, 187-90.
- MARCOS-ZAMBRANO, L. J., ESCRIBANO, P., SANCHEZ, C., MUNOZ, P., BOUZA, E. & GUINEA, J. 2014. Antifungal resistance to fluconazole and echinocandins is not emerging in yeast isolates causing fungemia in a Spanish tertiary care center. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 4565-72.
- MARTINEZ-JIMENEZ, M. C., MUNOZ, P., GUINEA, J., VALERIO, M., ALONSO, R., ESCRIBANO, P. & BOUZA, E. 2014. Potential role of *Candida albicans* germ tube antibody in the diagnosis of deep-seated candidemia. *Medical mycology*, 52, 270-5.
- MARTINEZ-JIMENEZ, M. C., MUNOZ, P., VALERIO, M., ALONSO, R., MARTOS, C., GUINEA, J. & BOUZA, E. 2015. *Candida* biomarkers in patients with candidaemia and bacteraemia. *J Antimicrob Chemother*, 70, 2354-61.
- MAYER, F. L., WILSON, D. & HUBE, B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4.
- MCCARTY, T. P. & PAPPAS, P. G. 2016. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*, 30, 103-24.
- MERMEL, L. A., ALLON, M., BOUZA, E., CRAVEN, D. E., FLYNN, P., O'GRADY, N. P., RAAD, II, RIJNDERS, B. J., SHERERTZ, R. J. & WARREN, D. K. 2009. Clinical

practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 49, 1-45.

MESA-ARANGO, A. C., FORASTIERO, A., BERNAL-MARTINEZ, L., CUENCA-ESTRELLA, M., MELLADO, E. & ZARAGOZA, O. 2013. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med Mycol*, 51, 461-72.

MIRANDA, L., RODRIGUES, E. C., COSTA, S. F., VAN DER HEIJDEN, I. M., DANTAS, K. C., LOBO, R. D., BASSO, M., VARKULJA, G. F., KREBS, V. L., GIBELLI, M. A., CRIADO, P. R. & LEVIN, A. S. 2012. *Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. *BMJ Open*, 2.

MIRANDA, L. N., VAN DER HEIJDEN, I. M., COSTA, S. F., SOUSA, A. P., SIENRA, R. A., GOBARA, S., SANTOS, C. R., LOBO, R. D., PESSOA, V. P., JR. & LEVIN, A. S. 2009. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect*, 72, 9-16.

MITCHELL, K., TAFF, H., CUEVAS, M., REINICKE, E., SANCHEZ, H. & ANDES, D. 2013. Role of matrix beta-1,3 glucan in antifungal resistance of non-*albicans* *Candida* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 57, 1918-20

MORITA, T. & NOZAWA, Y. 1985. Effects of antifungal agents on ergosterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*: differential inhibitory sites of naphthiomate and miconazole. *J Invest Dermatol*, 85, 434-7.

MUNOZ, P., GIANNELLA, M., FANCIULLI, C., GUINEA, J., VALERIO, M., ROJAS, L., RODRIGUEZ-CREIXEMS, M. & BOUZA, E. 2011. *Candida tropicalis* fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital. *Clin Microbiol Infect*, 17, 1538-45.

MUSKETT, H., SHAHIN, J., EYRES, G., HARVEY, S., ROWAN, K. & HARRISON, D. 2011. Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review. *Crit Care*, 15, R287.

NEDRET KOC, A., KOCAGOZ, S., ERDEM, F. & GUNDUZ, Z. 2002. Outbreak of nosocomial fungemia caused by *Candida glabrata*. *Mycoses*, 45, 470-5.

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70, 3321-3.

NETT, J. E., SANCHEZ, H., CAIN, M. T. & ANDES, D. R. 2010. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *J Infect Dis*, 202, 171-5.

NUCCI, M., ANAISSIE, E., BETTS, R. F., DUPONT, B. F., WU, C., BUELL, D. N., KOVANDA, L. & LORTHOLARY, O. 2010. Early removal of central venous catheter in

- patients with candidemia does not improve outcome: analysis of 842 patients from 2 randomized clinical trials. *Clin Infect Dis*, 51, 295-303.
- O'BRIEN, J., WILSON, I., ORTON, T. & POGNAN, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 267, 5421-6.
- O'TOOLE, G. A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*, 47,. pii: 2437.
- ODDS, F. C., BROWN, A. J. & GOW, N. A. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*, 11, 272-9.
- PAETKAU, D., CALVERT, W., STIRLING, I. & STROBECK, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol Ecol*, 4, 347-54.
- PAPPAS, P. G., KAUFFMAN, C. A., ANDES, D. R., CLANCY, C. J., MARR, K. A., OSTROSKY-ZEICHNER, L., REBOLI, A. C., SCHUSTER, M. G., VAZQUEZ, J. A., WALSH, T. J., ZAOUTIS, T. E. & SOBEL, J. D. 2016. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 62, e1-e50.
- PAREDES, K., PASTOR, F. J., CAPILLA, J., SUTTON, D. A., MAYAYO, E., FOTHERGILL, A. W. & GUARRO, J. 2014. Therapies against murine *Candida guilliermondii* infection, relationship between in vitro antifungal pharmacodynamics and outcome. *Rev Iberoam Micol*. 32, 34-9
- PEMAN, J., CANTON, E., QUINDOS, G., ERASO, E., ALCOBA, J., GUINEA, J., MERINO, P., RUIZ-PEREZ-DE-PIPAON, M. T., PEREZ-DEL-MOLINO, L., LINARES-SICILIA, M. J., MARCO, F., GARCIA, J., ROSELLO, E. M., GOMEZ, G. D.-L.-P. E., BORRELL, N., PORRAS, A. & YAGUE, G. 2012. Epidemiology, species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother*, 67, 1181-7.
- PERDONI, F., FALLENI, M., TOSI, D., CIRASOLA, D., ROMAGNOLI, S., BRAIDOTTI, P., CLEMENTI, E., BULFAMANTE, G. & BORGHI, E. 2014. A histological procedure to study fungal infection in the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Histochem*, 58, 2428.
- PERLIN, D. S. 2007. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat*, 10, 121-30.
- PERLIN, D. S. 2011. Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiol*, 6, 441-57.
- PERLIN, D. S. 2015. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Ann N Y Acad Sci*, 1354, 1-11.
- PERTOWSKI, C. A., BARON, R. C., LASKER, B. A., WERNER, S. B. & JARVIS, W. R. 1995. Nosocomial outbreak of *Candida albicans* sternal wound infections following cardiac surgery traced to a scrub nurse. *J Infect Dis*, 172, 817-22.

- PETRIKKOS, G. & SKIADA, A. 2007. Recent advances in antifungal chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents*, 30, 108-17.
- PEYTON, L. R., GALLAGHER, S. & HASHEMZADEH, M. 2015. Triazole antifungals: a review. *Drugs Today (Barc)*, 51, 705-18.
- PFALLER, M. A. 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med*, 125, S3-13.
- PFALLER, M. A., BOYKEN, L., HOLLIS, R. J., KROEGER, J., MESSER, S. A., TENDOLKAR, S. & DIEKEMA, D. J. 2008. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol*, 46, 150-6.
- PFALLER, M. A. & DIEKEMA, D. J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, 20, 133-63.
- PFALLER, M. A. & DIEKEMA, D. J. 2012. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol*, 50, 2846-56.
- PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J., MENDEZ, M., KIBBLER, C., ERZSEBET, P., CHANG, S. C., GIBBS, D. L. & NEWELL, V. A. 2006. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*, 44, 3551-6.
- PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J., RINALDI, M. G., BARNES, R., HU, B., VESELOV, A. V., TIRABOSCHI, N., NAGY, E. & GIBBS, D. L. 2005. 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*, 43, 5848-59.
- PIERCE, C. G., UPPULURI, P., TRISTAN, A. R., WORMLEY, F. L., JR., MOWAT, E., RAMAGE, G. & LOPEZ-RIBOT, J. L. 2008. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*, 3, 1494-500.
- PINHATI, H. M., CASULARI, L. A., SOUZA, A. C., SIQUEIRA, R. A., DAMASCENO, C. M. & COLOMBO, A. L. 2016. Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. *BMC Infect Dis*, 16, 433.
- POLKE, M., HUBE, B. & JACOBSEN, I. D. 2015. *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol*, 91, 139-235.
- PONTON, J. 2009. [Usefulness of biological markers in the diagnosis of invasive candidiasis]. *Rev Iberoam Micol*, 26, 8-14.

- PRICE, J., GORDON, N. C., CROOK, D., LLEWELYN, M. & PAUL, J. 2013. The usefulness of whole genome sequencing in the management of *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Microbiol Infect*, 19, 784-9.
- PRICE, J. R., GOLUBCHIK, T., COLE, K., WILSON, D. J., CROOK, D. W., THWAITES, G. E., BOWDEN, R., WALKER, A. S., PETO, T. E., PAUL, J. & LLEWELYN, M. J. 2014. Whole-genome sequencing shows that patient-to-patient transmission rarely accounts for acquisition of *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Clin Infect Dis*, 58, 609-18.
- PRIGITANO, A., CAVANNA, C., PASSERA, M., OSSI, C., SALA, E., LOMBARDI, G., GRANCINI, A., DE LUCA, C., BRAMATI, S., GELMI, M., TEJADA, M., GRANDE, R., FARINA, C., LALLITTO, F. & TORTORANO, A. M. 2016. CAND-LO 2014-15 study: changing epidemiology of candidemia in Lombardy (Italy). *Infection*, 44, 765-780.
- PUIG-ASENSIO, M., PADILLA, B., GARNACHO-MONTERO, J., ZARAGOZA, O., AGUADO, J. M., ZARAGOZA, R., MONTEJO, M., MUNOZ, P., RUIZ-CAMPS, I., CUENCA-ESTRELLA, M. & ALMIRANTE, B. 2013. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect*, 20, O245-54.
- PUIG-ASENSIO, M., PEMAN, J., ZARAGOZA, R., GARNACHO-MONTERO, J., MARTIN-MAZUELOS, E., CUENCA-ESTRELLA, M. & ALMIRANTE, B. 2014. Impact of therapeutic strategies on the prognosis of candidemia in the ICU. *Crit Care Med*, 42, 1423-32
- PULCRANO, G., ROSCETTO, E., IULA, V. D., PANELLIS, D., ROSSANO, F. & CATANIA, M. R. 2012. MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31, 2919-28.
- RAHMAN, D., MISTRY, M., THAVARAJ, S., NAGLIK, J. R. & CHALLACOMBE, S. J. 2012. Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonisation. *Methods Mol Biol*, 845, 527-35.
- RAJENDRAN, R., BORGHI, E., FALLENI, M., PERDONI, F., TOSI, D., LAPPIN, D. F., O'DONNELL, L., GREETHAM, D., RAMAGE, G. & NILE, C. 2015. Acetylcholine protects against *Candida albicans* infection by inhibiting biofilm formation and promoting hemocyte function in a *Galleria mellonella* infection model. *Eukaryot Cell*, 14, 834-44.
- RAJENDRAN, R., SHERRY, L., NILE, C. J., SHERRIFF, A., JOHNSON, E. M., HANSON, M. F., WILLIAMS, C., MUNRO, C. A., JONES, B. J. & RAMAGE, G. 2016. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013. *Clin Microbiol Infect*, 22, 87-93.

- RAMAGE, G., BACHMANN, S., PATTERSON, T. F., WICKES, B. L. & LOPEZ-RIBOT, J. L. 2002. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 49, 973-80.
- RAMAGE, G., JOSE, A., SHERRY, L., LAPPIN, D. F., JONES, B. & WILLIAMS, C. 2013. Liposomal amphotericin B displays rapid dose-dependent activity against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 2369-71.
- RAMAGE, G., SAVILLE, S. P., THOMAS, D. P. & LOPEZ-RIBOT, J. L. 2005. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*, 4, 633-8.
- REX, J. H., BENNETT, J. E., SUGAR, A. M., PAPPAS, P. G., SERODY, J., EDWARDS, J. E. & WASHBURN, R. G. 1995. Intravascular catheter exchange and duration of candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. *Clin Infect Dis*, 21, 994-6.
- REX, J. H., NELSON, P. W., PAETZNICK, V. L., LOZANO-CHIU, M., ESPINEL-INGROFF, A. & ANAISSIE, E. J. 1998. Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome *in vivo* for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 129-34.
- ROETZER, A., DIEHL, R., KOHL, T. A., RUCKERT, C., NUBEL, U., BLOM, J., WIRTH, T., JAENICKE, S., SCHUBACK, S., RUSCH-GERDES, S., SUPPLY, P., KALINOWSKI, J. & NIEMANN, S. 2013. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS Med*, 10, e1001387.
- ROILIDES, E., FARMAKI, E., EVDORIDOU, J., FRANCESCONI, A., KASAI, M., FILIOTI, J., TSIVITANIDOU, M., SOFIANOU, D., KREMENOPOULOS, G. & WALSH, T. J. 2003. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *J Clin Microbiol*, 41, 735-41.
- ROMEO, O., DELFINO, D., CASCIO, A., PASSO, C. L., AMORINI, M., ROMEO, D. & PERNICE, I. 2013. Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. *Infect Genet Evol*, 13, 105-8.
- RUAN, S. Y., LEE, L. N., JERNG, J. S., YU, C. J. & HSUEH, P. R. 2008. *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. *Clin Microbiol Infect*, 14, 136-40.
- RUEDA, C., CUENCA-ESTRELLA, M. & ZARAGOZA, O. 2014. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 1071-83.

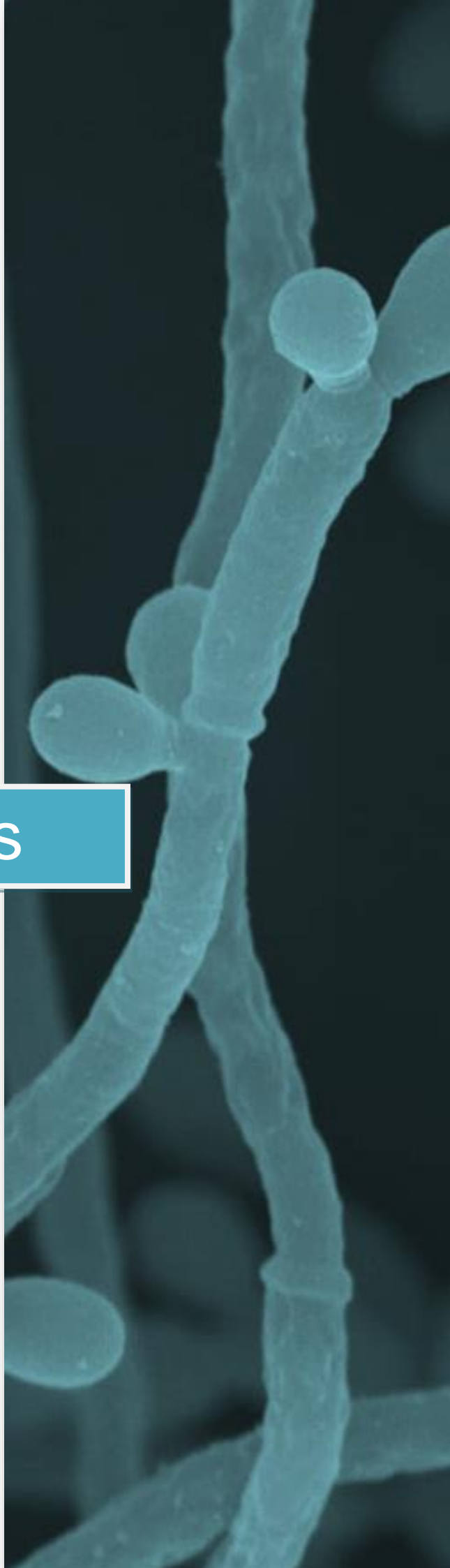
- RUEDA, C., PUIG-ASENSIO, M., GUINEA, J., ALMIRANTE, B., CUENCA-ESTRELLA, M. & ZARAGOZA, O. 2017. Evaluation of the possible influence of trailing and paradoxical effects on the clinical outcome of patients with candidemia. *Clin Microbiol Infect*, 23, 49 e1-49 e8.
- SABINO, R., SAMPAIO, P., ROSADO, L., STEVENS, D. A., CLEMONS, K. V. & PAIS, C. 2010. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates. *J Clin Microbiol*, 48, 1677-82.
- SAFDAR, A., RODRIGUEZ, G., ROLSTON, K. V., O'BRIEN, S., KHOURI, I. F., SHPALL, E. J., KEATING, M. J., KANTARJIAN, H. M., CHAMPLIN, R. E., RAAD, II & KONTOYIANNIS, D. P. 2007. High-dose caspofungin combination antifungal therapy in patients with hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 39, 157-64.
- SAMPAIO, P., GUSMAO, L., ALVES, C., PINA-VAZ, C., AMORIM, A. & PAIS, C. 2003. Highly polymorphic microsatellite for identification of *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol*, 41, 552-7.
- SAMPAIO, P., GUSMAO, L., CORREIA, A., ALVES, C., RODRIGUES, A. G., PINA-VAZ, C., AMORIM, A. & PAIS, C. 2005. New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. *J Clin Microbiol*, 43, 3869-76.
- SANDOVAL-DENIS, M., PASTOR, F. J., CAPILLA, J., SUTTON, D. A., FOTHERGILL, A. W. & GUARRO, J. 2014. *In vitro* pharmacodynamics and *in vivo* efficacy of fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a murine infection by *Candida lusitanae*. *Int J Antimicrob Agents*, 43, 161-4.
- SANGLARD, D., COSTE, A. & FERRARI, S. 2009. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res*, 9, 1029-50.
- SANO, T., OZAKI, K., TERAYAMA, Y., KODAMA, Y. & MATSUURA, T. 2014. A novel diabetic murine model of *Candida albicans*-induced mucosal inflammation and proliferation. *J Diab Res*, 2014, 509325.
- SAVINI, V., CATAVITELLO, C., ONOFRILLO, D., MASCIARELLI, G., ASTOLFI, D., BALBINOT, A., FEBBO, F., D'AMARIO, C. & D'ANTONIO, D. 2011. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses*, 54, 434-41.
- SCHELENZ, S., HAGEN, F., RHODES, J. L., ABDOLRASOULI, A., CHOWDHARY, A., HALL, A., RYAN, L., SHACKLETON, J., TRIMLETT, R., MEIS, J. F., ARMSTRONG-JAMES, D. & FISHER, M. C. 2016. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control*, 5, 35.

- SEIDLER, M., SALVENMOSER, S. & MULLER, F. M. 2010. Liposomal amphotericin B eradicates *Candida albicans* biofilm in a continuous catheter flow model. *FEMS Yeast Res*, 10, 492-5.
- SENDID, B., DUCOROY, P., FRANCOIS, N., LUCCHI, G., SPINALI, S., VAGNER, O., DAMIENS, S., BONNIN, A., POULAIN, D. & DALLE, F. 2013. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals. *Med Mycol*, 51, 25-32.
- SHEEHAN, D. J., HITCHCOCK, C. A. & SIBLEY, C. M. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev*, 12, 40-79.
- SHIELDS, R. K., NGUYEN, M. H., DU, C., PRESS, E., CHENG, S. & CLANCY, C. J. 2011. Paradoxical effect of caspofungin against *Candida* bloodstream isolates is mediated by multiple pathways but eliminated in human serum. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 2641-7.
- SHIELDS, R. K., NGUYEN, M. H., PRESS, E. G., CUMBIE, R., DRISCOLL, E., PASCULLE, A. W. & CLANCY, C. J. 2015. Rate of FKS Mutations among Consecutive *Candida* isolates causing bloodstream infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 7465-70.
- SHIELDS, R. K., NGUYEN, M. H., PRESS, E. G., KWA, A. L., CHENG, S., DU, C. & CLANCY, C. J. 2012. The presence of an *FKS* mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 4862-9.
- SHIN, J. H., BOUGNOUX, M. E., D'ENFERT, C., KIM, S. H., MOON, C. J., JOO, M. Y., LEE, K., KIM, M. N., LEE, H. S., SHIN, M. G., SUH, S. P. & RYANG, D. W. 2011. Genetic diversity among Korean *Candida albicans* bloodstream isolates: assessment by multilocus sequence typing and restriction endonuclease analysis of genomic DNA by use of BssHII. *J Clin Microbiol*, 49, 2572-7.
- SIMITSOPOULOU, M., PESHKOVA, P., TASINA, E., KATRAGKOU, A., KYRPITZI, D., VELEGRAKI, A., WALSH, T. J. & ROILIDES, E. 2013. Species-specific and drug-specific differences in susceptibility of *Candida* biofilms to echinocandins: characterization of less common bloodstream isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 2562-70.
- SLATER, J. L., HOWARD, S. J., SHARP, A., GOODWIN, J., GREGSON, L. M., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., ARENDRUP, M. C., WARN, P. A., PERLIN, D. S. & HOPE, W. W. 2011. Disseminated Candidiasis caused by *Candida albicans* with amino acid substitutions in *Fks1* at position Ser645 cannot be successfully treated with micafungin. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3075-83.

- ST-GERMAIN, G. 2001. Impact of endpoint definition on the outcome of antifungal susceptibility tests with *Candida* species: 24- versus 48-h incubation and 50 versus 80% reduction in growth. *Mycoses*, 44, 37-45.
- STEINBACH, W. J., LAMOTH, F. & JUVVADI, P. R. 2015. Potential Microbiological Effects of Higher Dosing of Echinocandins. *Clin Infect Dis*, 61 Suppl 6, S669-77.
- SULLIVAN, D. J., WESTERNENG, T. J., HAYNES, K. A., BENNETT, D. E. & COLEMAN, D. C. 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*, 141 (Pt 7), 1507-21.
- TADDEC, L., TALARMIN, J. P., GASTINNE, T., BRETONNIERE, C., MIEGEVILLE, M., LE PAPE, P. & MORIO, F. 2016. Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of *Candidemia* at a single French hospital: a 7-year study. *Mycoses*, 59, 296-303.
- TAFF, H. T., MITCHELL, K. F., EDWARD, J. A. & ANDES, D. R. 2013. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol*, 8, 1325-37.
- TAKAKURA, S., ICHIYAMA, S., BAIN, J. M., DAVIDSON, A. D., JACOBSEN, M. D., SHAW, D. J., GOW, N. A. & ODDS, F. C. 2008. Comparison of *Candida albicans* strain types among isolates from three countries. *Int J Med Microbiol*, 298, 663-8.
- TAVANTI, A., DAVIDSON, A. D., GOW, N. A., MAIDEN, M. C. & ODDS, F. C. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*, 43, 284-92.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST MIC distribution website [Online]. Disponible: <http://www.eucast.org> [Último acceso 29/03/2017 2017].
- TREVINO-RANGEL RDE, J., RODRIGUEZ-SANCHEZ, I. P., ELIZONDO-ZERTUCHE, M., MARTINEZ-FIERRO, M. L., GARZA-VELOZ, I., ROMERO-DIAZ, V. J., GONZALEZ, J. G. & GONZALEZ, G. M. 2014. Evaluation of *in vivo* pathogenicity of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* with different enzymatic profiles in a murine model of disseminated candidiasis. *Med Mycol*, 52, 240-5.
- TSAI, C. J., LOH, J. M. & PROFT, T. 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7, 214-29.
- TUMBARELLO, M., FIORI, B., TRECARCHI, E. M., POSTERARO, P., LOSITO, A. R., DE LUCA, A., SANGUINETTI, M., FADDA, G., CAUDA, R. & POSTERARO, B. 2012. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PLoS One*, 7, e33705.
- UPPULURI, P., SRINIVASAN, A., RAMASUBRAMANIAN, A. & LOPEZ-RIBOT, J. L. 2011. Effects of fluconazole, amphotericin B, and caspofungin on *Candida albicans*

- biofilms under conditions of flow and on biofilm dispersion. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3591-3.
- VALGUS, J. M. 2003. What's New in Antifungals? *Curr Infect Dis Rep*, 5, 16-21.
- VAN ASBECK, E. C., HUANG, Y. C., MARKHAM, A. N., CLEMONS, K. V. & STEVENS, D. A. 2007. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia*, 164, 287-93.
- VANSTRAELEN, K., LAGROU, K., MAERTENS, J., WAUTERS, J., WILLEMS, L. & SPRIET, I. 2013. The Eagle-like effect of echinocandins: what's in a name? *Expert Rev Anti Infect Ther*, 11, 1179-91.
- VAUGHAN-MARTINI, A., KURTZMAN, C. P., MEYER, S. A. & O'NEILL, E. B. 2005. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. *FEMS Yeast Res*, 5, 463-9.
- VAZ, C., SAMPAIO, P., CLEMONS, K. V., HUANG, Y. C., STEVENS, D. A. & PAIS, C. 2011. Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 71, 159-62.
- WALRAVEN, C. J., BERNARDO, S. M., WIEDERHOLD, N. P. & LEE, S. A. 2014. Paradoxical antifungal activity and structural observations in biofilms formed by echinocandin-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Med Mycol*, 52, 131-9.
- WALRAVEN, C. J. & LEE, S. A. 2013. Antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 1-8.
- WANG, H., ZHANG, L., KUDINHA, T., KONG, F., MA, X. J., CHU, Y. Z., KANG, M., SUN, Z. Y., LI, R. Y., LIAO, K., LU, J., ZOU, G. L., XIAO, M., FAN, X. & XU, Y. C. 2016. Investigation of an unrecognized large-scale outbreak of *Candida parapsilosis* sensu stricto fungaemia in a tertiary-care hospital in China. *Sci Rep*, 6, 27099.
- WHITE, T., T. BRUNS, S. LEE, AND J. TAYLOR. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: MICHAEL A. INNIS, D. H. G., JOHN J. SNINSKY AND THOMAS J. WHITE (ed.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press.
- WOJDA, I. 2016. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci*. [Epub ahead of print]
- WU, Y., ZHOU, H. J., CHE, J., LI, W. G., BIAN, F. N., YU, S. B., ZHANG, L. J. & LU, J. 2014. Multilocus microsatellite markers for molecular typing of *Candida tropicalis* isolates. *BMC Microbiol*, 14, 245.

Anexos



Producción Científica:

A continuación se anexan los artículos derivados de esta tesis.

1. [Use of molecular typing tools for the study of hospital outbreaks of candidemia]. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Rev Iberoam Micol. 2014 Apr-Jun;31(2):97-103. doi: 10.1016/j.riam.2013.06.003. Epub 2013 Jun 19. Review. Spanish.
2. Antifungal resistance to fluconazole and echinocandins is not emerging in yeast isolates causing fungemia in a Spanish tertiary care center. **Marcos-Zambrano LJ**, Escribano P, Sanchez C, Muñoz P, Bouza E, Guinea J. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(8):4565-72.
3. Comparison between the EUCAST procedure and the Etest for determination of the susceptibility of *Candida* species isolates to micafungin. **Marcos-Zambrano LJ**, Escribano P, Rueda C, Zaragoza O, Bouza E, Guinea J. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(11):5767-70.
4. Scope and frequency of fluconazole trailing assessed using EUCAST in invasive *Candida* spp. isolates. **Marcos-Zambrano LJ**, Escribano P, Sanchez-Carrillo C, Bouza E, Guinea J. Med Mycol. 2016;54(7):733-9.
5. Frequency of the paradoxical effect measured using EUCAST with micafungin, anidulafungin, and caspofungin against *Candida* spp. isolates causing candidemia. **Marcos-Zambrano LJ**, Escribano P, Sánchez-Carrillo C, Bouza E, Guinea J. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(1). pii: e01584-16.
6. Does identification to species level provide sufficient evidence to confirm catheter-related fungemia caused by *Candida albicans*? Escribano P, Guinea J, **Marcos-Zambrano LJ**, Recio S, Pelaez T, Rodriguez-Creixems M, Muñoz P, Bouza E. Med Mycol. 2013;51(7):769-73.
7. Is catheter-related candidemia a polyclonal infection? Escribano P, Guinea J, **Marcos-Zambrano LJ**, Martin-Rabadan P, Fernandez-Cruz A, Sanchez-Carrillo C, Muñoz P, Bouza E. Med Mycol. 2014;52(4):411-6.
8. Clusters of patients with candidaemia due to genotypes of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*: differences in frequency between hospitals. **Marcos-Zambrano LJ**, Escribano P, Sanguinetti M, Gomez García de la Pedrosa, De

- Carolis E, Vella A, Cantón R, Bouza E, Guinea J. Clin Microbiol Infect. 2015;21(7):677-83.
9. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **Marcos-Zambrano LJ**, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Int J Med Microbiol. 2014;304(8):1192-8.
 10. Micafungin is more active against *Candida albicans* biofilms with high metabolic activity. **Marcos-Zambrano LJ**, Escribano P, Gonzalez del Vecchio M, Bouza E, Guinea J. J Antimicrob Chemother. 2014;69(11):2984-7.
 11. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to caspofungin and anidulafungin is not affected by metabolic activity or biomass production. **Marcos-Zambrano LJ**, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Med Mycol. 2016;54(2):155-61.
 12. Biofilm Production and Antibiofilm Activity of Echinocandins and Liposomal Amphotericin B in Echinocandin-Resistant Yeast Species. **Marcos-Zambrano LJ**, Gomez-Perosanz M, Escribano P, Zaragoza O, Bouza E, Guinea J. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(6):3579-86.
 13. Comparison of the antifungal activity of micafungin and amphotericin B against *Candida tropicalis* biofilms. **Marcos-Zambrano LJ**, Escribano P, Bouza E, Guinea J. J Antimicrob Chemother. 2016;71(9):2498-501.



Revisión

Aplicación de las técnicas de tipificación molecular al estudio de brotes hospitalarios de candidemia

Laura Judith Marcos-Zambrano^{a,b}, Pilar Escribano^{a,b,c}, Emilio Bouza^{a,b,c,d} y Jesús Guinea^{a,b,c,d,*}

^a Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

^b Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, España

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES CD06/06/0058), Palma de Mallorca, España

^d Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 13 de febrero de 2013

Aceptado el 5 de junio de 2013

On-line el 19 de junio de 2013

Palabras clave:

Candidemia

Candida

Caracterización molecular

Tipificación molecular

Genotipado

Microsatélites

Brotes hospitalarios

R E S U M E N

La candidemia es una complicación infecciosa que afecta fundamentalmente a pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos así como en otros servicios hospitalarios, y cuya mortalidad puede alcanzar el 40%. La candidemia es una infección de adquisición típicamente hospitalaria, por lo que la transmisión horizontal de *Candida* spp. puede traducirse en la aparición de brotes nosocomiales. La caracterización genotípica de los aislamientos de *Candida* causantes de candidemia puede ayudar a esclarecer el origen de la infección, detectar los servicios hospitalarios con transmisión activa y, consecuentemente, mejorar su prevención. Diversas técnicas de tipificación molecular han sido empleadas para el estudio genotípico de aislamientos de *Candida*. Las técnicas basadas en microsatélites son reproducibles y presentan un alto poder de discriminación, lo que las convierte en opciones atractivas para el estudio de brotes de candidemia. La mayor parte de los brotes han sido descritos en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, fundamentalmente en neonatos. La presente revisión pretende discutir el papel de la caracterización genotípica de aislamientos de *Candida* causantes de candidemia para el estudio de brotes hospitalarios, así como describir las poblaciones más frecuentemente afectadas por las cepas epidémicas.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Use of molecular typing tools for the study of hospital outbreaks of candidemia

A B S T R A C T

Candidemia is an infectious complication mainly affecting hospitalized patients, particularly those admitted to intensive care units. Patient mortality can reach up to 40%. Candidemia is typically nosocomially-acquired, and horizontal transmission of *Candida* spp. can lead to the presence of outbreaks of candidemia. Genotyping of isolates of *Candida* causing candidemia can help us to understand the source of the infection, detect the hospital wards with active *Candida* spp. transmission and, consequently, improve the prevention of the infection. Several genotyping tools have been used for the molecular characterization of *Candida* isolates involved in outbreaks of candidemia. Genotyping procedures based on microsatellites are reproducible and show a high discriminatory power. Microsatellites are recommended for the study of outbreaks of candidemia. In most hospital outbreaks of candidemia, patients admitted to intensive care units are involved, mostly neonatal patients. The role of genotyping *Candida* isolates causing candidemia for the study of nosocomial outbreaks of candidemia is reviewed, as well as the patients more commonly affected by epidemic strains.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Candidemia

Candida

Molecular characterization

Molecular typing

Genotyping

Microsatellites

Hospital outbreaks

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jguineaortega@yahoo.es (J. Guinea).

Candida agrupa a varias especies de levaduras capaces de causar un amplio espectro de infecciones, entre las que destaca la candidiasis invasiva que afecta a pacientes hospitalizados. La candidemia es la forma de candidiasis invasiva más común. *Candida* ocupa el cuarto lugar en la incidencia de infecciones del

Antifungal Resistance to Fluconazole and Echinocandins Is Not Emerging in Yeast Isolates Causing Fungemia in a Spanish Tertiary Care Center

Laura Judith Marcos-Zambrano,^{a,b} Pilar Escribano,^{a,b,c} Carlos Sánchez,^{a,b} Patricia Muñoz,^{a,b,c,d} Emilio Bouza,^{a,b,c,d} Jesús Guinea^{a,b,c,d}

Clinical Microbiology and Infectious Diseases Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain^a; Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain^b; CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain^c; Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain^d

Accurate knowledge of fungemia epidemiology requires identification of strains to the molecular level. Various studies have shown that the rate of resistance to fluconazole ranges from 2.5% to 9% in *Candida* spp. isolated from blood samples. However, trends in antifungal resistance have received little attention and have been studied only using CLSI M27-A3 methodology. We assessed the fungemia epidemiology in a large tertiary care institution in Madrid, Spain, by identifying isolates to the molecular level and performing antifungal susceptibility testing according to the updated breakpoints of European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) definitive document (EDef) 7.2. We studied 613 isolates causing 598 episodes of fungemia in 544 patients admitted to our hospital (January 2007 to December 2013). Strains were identified after amplification and sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region and further tested for *in vitro* susceptibility to amphotericin B, fluconazole, posaconazole, voriconazole, micafungin, and anidulafungin. Resistance was defined using EUCAST species-specific breakpoints, and epidemiological cutoff values (ECOFFs) were applied as tentative breakpoints. Most episodes were caused by *Candida albicans* (46%), *Candida parapsilosis* (28.7%), *Candida glabrata* (9.8%), and *Candida tropicalis* (8%). Molecular identification enabled us to better detect cryptic species of *Candida guilliermondii* and *C. parapsilosis* complexes and episodes of polyfungal fungemia. The overall percentage of fluconazole-resistant isolates was 5%, although it was higher in *C. glabrata* (8.6%) and non-*Candida* yeast isolates (47.4%). The rate of resistance to echinocandins was 4.4% and was mainly due to the presence of intrinsically resistant non-*Candida* species. Resistance mainly affected non-*Candida* yeasts. The rate of resistance to fluconazole and echinocandins did not change considerably during the study period.

Fungemia is a major cause of morbidity and mortality in both critically ill and non-critically ill patients (1, 2). Although *Candida albicans* is the main species causing fungemia, other non-*Candida* and non-*Candida* species showing diminished antifungal susceptibility are emerging (2, 3). Knowledge of the epidemiology of the species causing fungemia is clinically relevant, particularly when starting empirical antifungal treatment, since antifungal susceptibility patterns are species specific (4, 5).

The distribution of *Candida* spp. causing fungemia varies with the geographic region studied (6–9). However, identification of strains to the molecular level is necessary to obtain an accurate picture of the species causing fungemia, because cryptic species in *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, and *Candida guilliermondii* complexes often go undetected by conventional identification procedures, such as the ID 32C system (10).

Previous reports have shown that the rate of resistance to fluconazole ranges from 2.5% to 9% in *Candida* spp. isolated from blood samples (3, 11). Echinocandins are fast becoming first-line antifungal agents for the treatment of fungemia (12, 13); however, increasing use of these agents can promote the emergence of resistance in *Candida* and non-*Candida* isolates (14). Reports on trends in the rate of antifungal resistance in isolates causing fungemia are scarce, and the few studies performed were based only on the CLSI M27-A3 method (4, 5). In contrast, the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) procedure has rarely been used to study trends in antifungal resistance in single institutions over long periods.

The aim of the present study was to assess the epidemiology of

fungemia in a large tertiary care institution located in Madrid, Spain, over a 7-year period after identifying isolates to the molecular level and performing antifungal susceptibility testing according to the updated breakpoints of EUCAST definitive document (EDef) 7.2 (15).

(This study was presented in part at the 22nd European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, United Kingdom, 31 March to 3 April 2012 [abstr. P-834] [16] and at the 24th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain, 10 to 13 March 2014 [abstr. eP234] [17].)

MATERIALS AND METHODS

Hospital description, definition of fungemia episodes, and patients studied. Hospital Gregorio Marañón serves a population of approximately 715,000 inhabitants in the city of Madrid, Spain, and cares for patients at high risk of fungemia, such as those admitted to medical and surgical intensive care units (ICUs), neonates, patients with hematology-

Received 26 February 2014 Returned for modification 7 May 2014

Accepted 21 May 2014

Published ahead of print 27 May 2014

Address correspondence to Jesús Guinea, jguineaortega@yahoo.es.

L.J.M.-Z. and P.E. contributed equally to this article.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.02670-14

Comparison between the EUCAST Procedure and the Etest for Determination of the Susceptibility of *Candida* Species Isolates to Micafungin

Laura Judith Marcos-Zambrano,^{a,b} Pilar Escribano,^{a,b,c} Cristina Rueda,^e Óscar Zaragoza,^e Emilio Bouza,^{a,b,c,d} Jesús Guinea^{a,b,c,d}

Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain^a; Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain^b; CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CD06/06/0058), Palma de Mallorca, Spain^c; Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain^d; Mycology Reference Laboratory, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain^e

We compared the ability of the EUCAST EDef 7.2 and the Etest to detect the susceptibility to micafungin of 160 *Candida* and non-*Candida* clinical isolates. Agreement was higher when Etest MICs were obtained after 24 h of incubation; essential agreement was 90%, and categorical agreement was >90%. False susceptibility was seen only for *Candida krusei* (10%), and false resistance was observed in 6% of the isolates, ranging from 2.6% (*C. glabrata*) to 13% (*C. albicans*).

The CLSI M27-A3 and EUCAST broth microdilution procedures are the gold standard for antifungal susceptibility testing and can detect micafungin-resistant isolates (1–6). These procedures are comparable, and the results obtained correlated with clinical outcome (7–9). However, they are time-consuming and difficult to implement in clinical microbiology laboratories.

The Etest (bioMérieux) is a fast and cost-effective alternative, and agreement with CLSI M27-A3 is high when testing the susceptibility of *Candida* spp. to micafungin (10–12). Agreement between the Etest and the EUCAST procedure is also high for caspofungin (13, 14). We compared for the first time EUCAST and the Etest for detection of susceptibility to micafungin in a collection of *Candida* isolates.

Organisms and identification. We studied 160 yeast strains obtained from patients with fungemia admitted to Gregorio Marañón Hospital (2007 to 2013) (Table 1). The 17 control isolates (5 strains with *fks* hot spot [HS] mutations and 12 intrinsically echinocandin-resistant non-*Candida* isolates) were included in the analysis (Tables 1 and 2).

Antifungal susceptibility testing. The *in vitro* susceptibility was obtained by means of the EUCAST and the Etest methods. For EUCAST EDef 7.2., the plates were incubated for 24 h at 35°C, and MIC values were determined spectrophotometrically at 530 nm (15, 16); a minimum threshold of optical density of ≥ 0.3 was used

for growth control wells to validate the reading of the plates. Non-*Candida* isolates were incubated with shaking at 30°C. All MICs could be obtained after 24 h of incubation. *Candida krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were used as quality control strains.

Etest strips containing micafungin at concentrations ranging from 0.002 to 32 $\mu\text{g/ml}$ were used. The plates were incubated at 35°C and read after 24 h and 48 h of incubation. The MIC value was defined as the lowest concentration of micafungin at which the zone of inhibition intersects the strip; microcolonies in the inhibition zone were not taken into account.

Identification of *fks* mutations. HS1 and HS2 from the *fks* genes of the 5 *Candida* control isolates were amplified as previously described (17–19) (Table 2). The presence of *fks* mutations

Received 14 May 2013 Returned for modification 12 July 2013

Accepted 22 August 2013

Published ahead of print 26 August 2013

Address correspondence to Jesús Guinea, jguineaortega@yahoo.es.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.01032-13

TABLE 1 Activity of micafungin against the 160 isolates using the EUCAST EDef 7.2 procedure and the Etest read after 24 h and 48 h of incubation

Species	n	MIC ₉₀ , $\mu\text{g/ml}$ (range)		
		EUCAST	Etest, 24 h ^a	Etest, 48 h
<i>C. albicans</i>	31	≤ 0.015 (≤ 0.015 –1)	0.062 (≤ 0.015 – ≥ 16)	0.125 (≤ 0.015 – ≥ 16)
<i>C. parapsilosis</i>	27	2 (0.25–2)	1 (≤ 0.015 –1)	2 (0.25– ≥ 16)
<i>C. glabrata</i>	40	≤ 0.015 (≤ 0.015 –1)	≤ 0.015 (≤ 0.015 –0.25)	0.031 (≤ 0.015 –2)
<i>C. tropicalis</i>	28	0.25 (≤ 0.015 –2)	1 (≤ 0.015 –2)	4 (≤ 0.015 – ≥ 16)
<i>C. krusei</i>	10	1 (≤ 0.015 –1)	0.25 (0.062–0.25)	0.25 (0.125–0.25)
<i>Candida</i> spp. ^b	12	1 (≤ 0.015 –1)	1 (≤ 0.015 –1)	≥ 16 (≤ 0.015 – ≥ 16)
Other yeasts	12	8 (0.125–8)	≥ 16 (≥ 16 – ≥ 16)	≥ 16 (1– ≥ 16)
Overall ^c	160	2 (≤ 0.015 –8)	0.5 (≤ 0.015 – ≥ 16)	4 (≤ 0.015 – ≥ 16)

^a For Etest read at 24 h, 55.5% of *C. parapsilosis* isolates, 5% of *C. glabrata* isolates, 16.6% of other *Candida* isolates, and 66.6% of other yeasts did not grow and were excluded from the analysis.

^b *Candida* isolates belonging to species without proposed breakpoints or epidemiological cutoffs according to the EUCAST EDef 7.2 procedure.

^c Strains were identified after amplification and sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region (23); the distribution of isolates was as follows: *C. albicans*, n = 31; *C. parapsilosis* complex, n = 27 (*C. parapsilosis sensu stricto*, n = 24; *C. orthopsilosis*, n = 3); *C. glabrata*, n = 40; *C. krusei*, n = 10; *C. tropicalis*, n = 28; *Candida* spp., n = 12 (*C. dubliniensis*, n = 5; *C. guilliermondii*, n = 4; *C. kefyr*, n = 1; *C. lusitanae*, n = 1; *Pichia caribbica*, n = 1); and other yeasts, n = 12 (*Rhodotorula mucilaginosa*, n = 7; *Trichosporon* spp., n = 5).



Original Article

Scope and frequency of fluconazole trailing assessed using EUCAST in invasive *Candida* spp. isolates

Laura Judith Marcos-Zambrano^{1,2}, Pilar Escribano^{1,2,3},
Carlos Sánchez-Carrillo^{1,2,3}, Emilio Bouza^{1,2,3,4} and Jesús Guinea^{1,2,3,4,*}

¹Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, ²Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain, ³CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain and ⁴Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

*To whom correspondence should be addressed. Jesús Guinea, Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain.

Tel: +34 915867163; Fax: +34 915044906; E-mail: jguineaortega@yahoo.es

This study was presented in part at the 7th Trends in Medical Mycology conference (P002), Lisbon, Portugal, 2015.

Received 25 January 2016; Revised 2 March 2016; Accepted 23 March 2016

Abstract

Trailing is a well-known phenomenon that is defined as reduced but persistent visible growth of *Candida* spp. at fluconazole concentrations above the MIC. Trailing is commonly detected using the CLSI M27-A3 method, although little is known about its frequency when investigated with EUCAST. We assessed the frequency and scope of fluconazole trailing after using EUCAST EDef 7.2. against a large number of *Candida* spp. isolates from patients with candidemia. We studied 639 fluconazole-susceptible non-*krusei* *Candida* spp. isolates from 570 patients admitted to Gregorio Marañón Hospital. Isolates were tested *in vitro* for fluconazole susceptibility according to the EUCAST EDef 7.2 procedure; trailing was defined as the presence of any residual growth in wells containing fluconazole concentrations above the MIC. According to the mean percentage of trailing observed, isolates were classified as residual trailers (0.1–5%), slight trailers (6%–10%), moderate trailers (11%–15%), and heavy trailers (>15%). The relationship between trailing and genotyping was assessed. The mean overall percentage of trailing was 6.8%, with *C. albicans* and *C. tropicalis* showing the highest percentages (9.75% and 9.29%, respectively; $P < .001$). *C. albicans* and *C. tropicalis* had the highest percentage of heavy trailers (>15%). Trailing was not genotype-specific. Fluconazole trailing was observed frequently when EUCAST was used for antifungal susceptibility testing, particularly in isolates of *C. albicans* and *C. tropicalis*. The cut-off proposed enabled us to classify the isolates according to the degree of trailing and can be used as the basis for future studies to evaluate the clinical impact of this phenomenon.



Frequency of the Paradoxical Effect Measured Using the EUCAST Procedure with Micafungin, Anidulafungin, and Caspofungin against *Candida* Species Isolates Causing Candidemia

Laura Judith Marcos-Zambrano,^{a,b} Pilar Escribano,^{a,b} Carlos Sánchez-Carrillo,^{a,b,c} Emilio Bouza,^{a,b,c,d}  Jesús Guinea^{a,b,c,d}

Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain^a; Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain^b; CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain^c; Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain^d

ABSTRACT We report data on the frequency of the paradoxical effect of echinocandins against *Candida* spp. ($n = 602$ incident isolates) using the EUCAST definitive document EDef 7.2 procedure. The paradoxical effect for one or more echinocandins was observed in 16% of the isolates. However, differences between species were found, and the paradoxical effect was more common in *Candida tropicalis* ($P < 0.001$). Caspofungin was the drug in which the paradoxical effect was most common, followed by anidulafungin and micafungin ($P < 0.001$).

KEYWORDS paradoxical effect, echinocandins, *Candida*, EUCAST

Treatment with echinocandins, i.e., caspofungin, micafungin, and anidulafungin, is recommended as the primary therapy for patients with candidemia (1, 2). Rates of resistance are low (3), but attenuation of activity at high concentrations, known as the paradoxical or Eagle effect, has been reported (4–7). Isolates are characterized by abnormal morphology when studied in the presence of high concentrations of echinocandins (8–10). Although it has been reported for all three echinocandins, differences in frequency by species have been pointed out, mostly by use of CLSI methodology (4, 11, 12). Antifungal lock therapy may prevent catheter removal in patients with candidemia. Since the procedure requires the catheter lumen to be filled with a solution containing a high concentration of echinocandins (13), the paradoxical effect may have a negative impact (14, 15).

(This study was presented in part at the 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases [ECCMID], Amsterdam, Netherlands, 9 to 12 April 2016 [electronic poster EP0008].)

We studied the frequency of the paradoxical effect of echinocandins against 602 echinocandin-susceptible *Candida* species incident isolates from the blood cultures of patients with candidemia who were admitted to Gregorio Marañón Hospital from January 2007 to March 2015. All the strains were molecularly identified (Table 1) (16), and antifungal susceptibility to micafungin (Astellas Pharma, Inc., Tokyo, Japan), anidulafungin (Pfizer Pharmaceutical Group, New York, NY), and caspofungin (Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, NJ) was determined using the EUCAST definitive document EDef 7.2 procedure (17). The candin concentrations tested ranged from 0.015 to 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. *Candida krusei* ATCC 6258 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019 isolates were used as quality control strains. The paradoxical effect was defined as an increase in optical density of 0.02 compared with the growth control in wells containing a candin

Received 20 July 2016 Returned for modification 20 September 2016 Accepted 24 October 2016

Accepted manuscript posted online 31 October 2016

Citation Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Sánchez-Carrillo C, Bouza E, Guinea J. 2017. Frequency of the paradoxical effect measured using the EUCAST procedure with micafungin, anidulafungin, and caspofungin against *Candida* species isolates causing candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01584-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01584-16>.

Copyright © 2016 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Jesús Guinea, jguineaortega@yahoo.es.

Does identification to species level provide sufficient evidence to confirm catheter-related fungemia caused by *Candida albicans*?

PILAR ESCRIBANO*†‡, JESÚS GUINEA*†‡§#, LAURA MARCOS-ZAMBRANO*†, SANDRA RECIO*†, TERESA PELÁEZ*†‡§#, MARTA RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS*†‡#, PATRICIA MUÑOZ*†‡§# & EMILIO BOUZA*†‡§#

*Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, †Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, ‡CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CD06/06/0058), Palma de Mallorca, §Medicine Department, Faculty of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, and #Red Española para la investigación en Patología Infecciosa (REIPI), RD06/0008/1025

We retrospectively studied 22 patients with catheter-related candidemia caused by *Candida albicans*. Strains isolated simultaneously from blood and catheter tips were genotyped using six microsatellite markers. Matches between genotypes of isolates recovered from both sample sources were found in 20/22 (91%) patients. Consequently, identification of the same species from both the catheter tip and blood could be used to confirm catheter-related candidemia.

Keywords *C. albicans*, catheter-related candidemia, candidemia, genotyping, short tandem repeats, microsatellites, blood culture, catheter tip culture

Introduction

Candida albicans fungemia is a major cause of morbidity and mortality in hospitalized patients worldwide [1,2]. Catheters are commonly suspected of being the source of these infections [3,4]. According to the recently updated guidelines on the management of intravascular catheter-related infections of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), the definitive diagnosis of catheter-related candidemia (CRC) requires the isolation and identification of the same species from both the catheter tip and blood [5]. However, such findings may be insufficient in cases where isolates of different genotypes are recovered from these two types of samples.

Several molecular methods have been developed to genotype *C. albicans* isolates, including Southern blot

hybridization with discriminating probes [6], electrophoretic karyotyping [7], restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis [8], randomly amplified polymorphism DNA (RAPD) analysis [7], multilocus sequence typing (MLST) [8], and microsatellite (short tandem repeats; STR) analysis [9–13]. Procedures based on STRs are characterized by high discriminatory power, codominance, and reproducibility.

We found only one study in which *C. albicans* strains obtained from catheter tips and blood of patients with CRC were analyzed to investigate the presence of clonally related genotypes present in both samples [14]. While the genotyping procedures employed were all based on electrophoresis, we used STRs to study genotypes of *C. albicans* isolates recovered from blood and catheter tips of CRC patients to determine whether the genotypes found in the blood samples were identical to those associated with catheter tips.

Materials and methods

Blood and catheter culture procedures and definition of CRC

We retrospectively studied 22 patients admitted to our hospital, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, from January 2008 to December 2010 from whom

Received 5 September 2012; Received in final revised form 28 February 2013; Accepted 3 May 2013.

³This study was presented in part at the 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID; Poster P-746), 31 March–3 April 2012, London, UK.

Correspondence: Jesús Guinea, Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas-HIV, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 5867163; fax: +34 91 3721721; E-mail: jguineaortega@yahoo.es



Short Communication

Is catheter-related candidemia a polyclonal infection?

**P. Escribano^{1,2,3}, J. Guinea^{1,2,3,4,*}, L.J. Marcos-Zambrano^{1,2},
P. Martín-Rabadán^{1,2,3,4}, A. Fernández-Cruz^{1,2,4}, C. Sánchez-Carrillo^{1,2,3},
P. Muñoz^{1,2,3,4} and E. Bouza^{1,2,3,4}**

¹Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, ²Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, ³CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES, Palma de Mallorca and ⁴Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

*To whom correspondence should be addressed. Jesús Guinea, Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas-HIV, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain. Tel: +00 34 91 5867163; Fax: +00 34 91 3721721; E-mail: jguineaortega@yahoo.es

Received 29 July 2013; Revised 10 October 2013; Accepted 10 November 2013

Abstract

Diagnosis of catheter-related candidemia (CRC) requires the simultaneous isolation of *Candida* spp. from both blood and catheter samples. We previously observed that in most CRC cases, the genotype of the yeast found in catheter samples is also recovered from blood. However, it is not clear whether CRC is a polyclonal infection. We prospectively studied 20 patients with CRC caused by *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, or *C. glabrata* to analyze whether their infections were polyclonal. As many as 10 colonies per sample ($n = 475$) isolated from blood ($n = 220$) and catheter ($n = 255$) specimens were studied using species-specific microsatellite markers. Genotyping always revealed matches between the *Candida* spp. from blood and catheter samples. However, 15% of patients had a polyclonal pattern of infection or catheter colonization that was species specific. An additional genotype was found exclusively in the catheters of two patients infected with *C. albicans*, whereas an additional genotype was noted in the blood culture of a patient infected with *C. parapsilosis*. Considering only the presence of different genotypes in blood samples, 5% of patients had polyclonal infections. We conclude that most cases of CRC are caused by a single genotype.

Key words: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, catheter-related candidemia, candidemia, genotyping, microsatellites, polyclonal, blood culture, catheter culture.

This study was presented in part at the 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID; Poster P-1077), 27 April–30 April 2013, Berlin, Germany.

Introduction

Candida species cause approximately 8% of catheter-related bloodstream infections [1–2]. *C. albicans* and *C. parapsilosis* are the two species most frequently involved in catheter-related candidemia (CRC), although

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>

Clusters of patients with candidaemia due to genotypes of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*: differences in frequency between hospitals

L. J. Marcos-Zambrano^{1,2}, P. Escribano^{1,2,3}, M. Sanguinetti⁴, E. Gómez G. de la Pedrosa^{5,6}, E. De Carolis⁴, A. Vella⁴, R. Cantón^{5,6}, E. Bouza^{1,2,3,7} and J. Guinea^{1,2,3,7}

1) Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, 2) Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, 3) CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain, 4) Institute of Microbiology, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy, 5) Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Biomédica, Madrid, 6) Red Española de Investigación en Patología Infecciosa, Seville and 7) Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

The presence of clusters (identical genotypes infecting different patients) suggests patient-to-patient transmission or a common source for strains. We report the results of a genotyping study based on microsatellite markers of *Candida albicans* ($n = 179$) and *Candida parapsilosis* ($n = 76$) causing candidaemia, to assess and compare the percentage of patients grouped in clusters during the study period (January 2010 to December 2012). The study was performed in two large tertiary hospitals in Madrid, Spain. We detected 145 *C. albicans* genotypes (21 in clusters) and 63 *C. parapsilosis* genotypes (seven in clusters). Clusters involved two to seven patients each. Most of the clusters in the two centres involved two patients for both species, but the number of patients included in each cluster differed between hospitals. Considering both species, the percentage of patients per cluster ranged from 19% to 38% ($p < 0.05$) in Hospital A and B respectively. Up to 2.9% of genotypes were present in both hospitals. Clusters of *C. albicans* and *C. parapsilosis* genotypes causing candidaemia differed between hospitals, suggesting differences in strain transmission. Occasionally, the same genotypes were found in patients admitted to different hospitals located in the same city.

Clinical Microbiology and Infection © 2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, clusters, genotyping, Madrid, microsatellites, Spain

Original Submission: 18 December 2014; **Revised Submission:** 14 March 2015; **Accepted:** 15 March 2015

Editor: E. Roilides

Article published online: 13 April 2015

This study was presented in part at the 24th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Barcelona (Poster eP-378).

Corresponding author: J. Guinea, Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/Dr. Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain

Corresponding author: P. Escribano, Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/Dr. Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain

E-mails: pilar.escribano.martos@gmail.com (P. Escribano), jguineaortega@yahoo.es (J. Guinea)

Introduction

Candida spp. are the main cause of invasive fungal infections, with *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* being the most common entities in most geographical areas [1]. Exogenous strains of *C. albicans* and *C. parapsilosis* can infect patients admitted to hospital and cause outbreaks of candidaemia [2]. Highly discriminatory genotyping procedures are useful when investigating the genetic relationships between isolates [2]. The presence of clusters (identical genotypes infecting different patients) suggests patient-to-patient transmission or a common source for strains. We previously observed that up to 11% of *C. albicans* genotypes and 18% of *C. parapsilosis* genotypes



Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points



Laura Judith Marcos-Zambrano^{a,b}, Pilar Escribano^{a,b,c},
Emilio Bouza^{a,b,c,d}, Jesús Guinea^{a,b,c,d,*}

^a Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^b Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^c CIBER Enfermedades Respiratorias – CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain

^d Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 December 2013

Received in revised form 15 July 2014

Accepted 24 August 2014

Keywords:

Candida

Non-candida

Candidemia

Biofilm

Crystal violet

XTT

Cut-off

Biofilm-forming

ABSTRACT

Biofilm production in *Candida* spp. can be studied by measuring the biomass produced after application of crystal violet stain or by measuring metabolic activity with XTT. Our study is the first in which crystal violet and XTT are compared to analyze the ability of clinically relevant *Candida* and non-*Candida* species to produce biofilm. We studied 577 isolates causing fungemia in 512 patients admitted from January 2007 to July 2013. Based on the biomass production measured by crystal violet and the metabolic activity measured by XTT, strains were divided into terciles to establish tentative cut-offs to classify isolates as being low, moderate, or high biofilm-forming and as having low, moderate, or high metabolic activity. Considerable variability in biofilm production and metabolic activity was found both between species and within species. *C. tropicalis* showed the highest biomass production, whereas *C. glabrata* showed the highest metabolic activity, and non-*Candida* species isolates showed the lowest metabolic activity ($P < 0.0023$). The isolates were classified as low metabolic activity, moderate metabolic activity, and high metabolic activity according to their cut-offs by XTT (<0.097 , $0.097-0.2$, and >0.2) and as low biofilm-forming, moderate biofilm-forming, and high biofilm-forming according to their cut-offs by crystal violet (<0.44 , $0.44-1.17$, and >1.17). The overall categorical agreement between the procedures was 43.7%, which increased to $>50\%$ for *C. albicans* and *C. parapsilosis*. XTT and crystal violet are complementary procedures for the study of biofilm production.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Candida spp. is the main causal agent of invasive fungal infections in hospitalized patients. The ability to form biofilm enables *Candida* spp. to cause catheter-related candidemia (Ferreira et al., 2013; Hasan et al., 2009; Ramage et al., 2006), a disease that requires the catheter to be removed (Mermel et al., 2009). Biofilm-attached cells are less susceptible to antifungal agents and can

evade the immune response (Mathe and Van Dijck, 2013; Ramage et al., 2006, 2005). Furthermore, patients with candidemia caused by biofilm-forming strains have a worse outcome than those infected by non-biofilm-forming strains (Tumbarello et al., 2012).

Several *Candida* species are able to form biofilm, although extracellular matrix structure and composition of the biofilm vary markedly between species (Costa et al., 2013; Ferreira et al., 2013; Kuhn et al., 2002; Pannanusorn et al., 2012; Parahitayawa et al., 2006; Seneviratne et al., 2009; Silva et al., 2009). Furthermore, strain-to-strain variability can be observed within isolates from the same species (Hasan et al., 2009; Li et al., 2003). Data on biofilm production in a large number of invasive *Candida* isolates obtained from blood cultures are lacking.

Candida biofilm production can be quantified using various methods. Procedures carried out in 96-well polystyrene plates are fast and reliable and make it possible to test multiple isolates (Peeters et al., 2008; Pierce et al., 2010). The most widely used

Abbreviations: CV, crystal violet stain; LMA, low metabolic activity; MMA, moderate metabolic activity; HMA, high metabolic activity; LBF, low biofilm-forming; MBF, moderate biofilm-forming; HBF, high biofilm-forming.

* Corresponding author at: Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón C/Dr. Esquerdo, 46 28007 Madrid, Spain. Tel.: +34 914265104; fax: +34 915044906.

E-mail address: jguineaortega@yahoo.es (J. Guinea).

Micafungin is more active against *Candida albicans* biofilms with high metabolic activity

Laura Judith Marcos-Zambrano^{1,2}, Pilar Escribano¹⁻³, Marcela González del Vecchio^{1,2}, Emilio Bouza¹⁻⁴ and Jesús Guinea^{1-4*}

¹Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ²Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ³CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain; ⁴Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-915867163; Fax: +34-915044906; E-mail: jguineaortega@yahoo.es

Received 5 March 2014; returned 2 May 2014; revised 21 May 2014; accepted 23 May 2014

Background: The ability to form biofilm enables *Candida* spp. to cause catheter-related candidaemia. The use of agents with *in vitro* activity against *Candida albicans* biofilms, such as micafungin, could obviate catheter removal. The metabolic activity of *C. albicans* biofilms is strain-dependent, and cell wall formation is thought to be more prominent in biofilms showing high metabolic activity.

Methods: We studied the antifungal activity of micafungin against 265 *C. albicans* isolates with different degrees of metabolic activity causing fungaemia in 246 patients admitted to Gregorio Marañón Hospital (January 2007 to June 2013). All strains were classified according to the metabolic activity of their biofilm, which was classified as low, moderate and high using XTT. Micafungin MICs for planktonic and sessile cells were assessed using the EUCAST E.Def 7.2 procedure and XTT reduction assay, respectively. The MIC was defined as a 50% and 80% reduction in metabolic activity compared with the control well.

Results: Micafungin was uniformly more active against planktonic cells than against sessile cells (MIC₅₀ ≤ 0.015 versus 8 mg/L), although it was not consistently active against all *C. albicans* biofilms. Isolates with low metabolic activity biofilms showed the lowest susceptibility to micafungin, followed by moderate and high metabolic activity biofilms ($P < 0.001$).

Conclusions: Our study suggests that the metabolic activity of biofilm may have a role in future evaluations of micafungin for the eradication of *C. albicans* biofilms (e.g. the lock therapy approach).

Keywords: *C. albicans*, candidaemia, fungaemia, XTT, antifungal activity

Introduction

The ability of *C. albicans* to form biofilm in catheters and other bioprosthetic devices facilitates the development of catheter-related candidaemia.¹ Management of catheter-related candidaemia often requires catheter removal, although this is not always possible.²

Amphotericin B liposomal formulation and the echinocandins have *in vitro* antifungal activity against preformed *Candida* spp. biofilms.^{3,4} The clinical impact of antibiofilm activity is demonstrated by the fact that patients with fungaemia receiving amphotericin B or echinocandins did not benefit from early catheter removal.⁵ Removal of catheters colonized by *Candida* biofilms can be avoided by using antifungal lock therapy.⁶ Tests to elucidate whether *C. albicans* catheter biofilms can be eradicated by lock therapy are necessary.

Micafungin is an echinocandin that inhibits fungal cell wall biosynthesis by blocking 1,3-β-D-glucan synthetase. The metabolic activity of biofilm is proportional to the number of *Candida* cells present;⁷ therefore, we hypothesize that metabolic activity could be a surrogate marker of cell division and fungal wall biosynthesis.

We previously showed considerable variability in terms of metabolic activity in preformed *C. albicans* biofilms, with up to 30% of isolates exhibiting high metabolic activity (HMA).⁸ Theoretically, the most pronounced antifungal effect of micafungin would be observed against *C. albicans* biofilms with HMA and high fungal wall formation, although to our knowledge this has not been studied. We proved that optimal antifungal activity of micafungin is observed against preformed *C. albicans* biofilms with HMA, thus suggesting that the metabolic activity of biofilms should be taken into account when evaluating the role of antifungal lock therapy.



Original Article

Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to caspofungin and anidulafungin is not affected by metabolic activity or biomass production

Laura Judith Marcos-Zambrano^{1,2}, Pilar Escribano^{1,2,3}, Emilio Bouza^{1,2,3,4} and Jesús Guinea^{1,2,3,4,*}

¹Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, ²Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain, ³CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain and ⁴Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

*To whom correspondence should be addressed. Jesús Guinea, Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain.

Tel: +34 915867163; Fax: +34 915044906; E-mail: jguineaortega@yahoo.es

This study was partially presented at the 7th Trends in Medical Mycology Congress, Lisbon, Portugal, 2015 (Poster P001).

Received 30 June 2015; Revised 31 August 2015; Accepted 14 September 2015

Abstract

Micafungin is more active against biofilms with high metabolic activity; however, it is unknown whether this observation applies to caspofungin and anidulafungin and whether it is also dependent on the biomass production. We compare the antifungal activity of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against preformed *Candida albicans* biofilms with different degrees of metabolic activity and biomass production from 301 isolates causing fungemia in patients admitted to Gregorio Marañón Hospital (January 2007 to September 2014). Biofilms were classified as having low, moderate, or high metabolic activity according to XTT reduction assay or having low, moderate, or high biomass according to crystal violet assay. Echinocandin MICs for planktonic and sessile cells were measured using the EUCAST E.Def 7.2 procedure and XTT reduction assay, respectively. Micafungin showed the highest activity against biofilms classified according to the metabolic activity and biomass production ($P < .001$). The activity of caspofungin and anidulafungin was not dependent on the metabolic activity of the biofilm or the biomass production. These observations were confirmed by scanning electron microscopy. None of the echinocandins produced major changes in the structure of biofilms with low metabolic activity and biomass production when compared with the untreated biofilms. However, biofilm with high metabolic activity or high biomass production was considerably more susceptible to micafungin; this effect was not shown by caspofungin or anidulafungin.

Key words: Echinocandins, micafungin, EUCAST, biofilm.

Biofilm Production and Antibiofilm Activity of Echinocandins and Liposomal Amphotericin B in Echinocandin-Resistant Yeast Species

Laura Judith Marcos-Zambrano,^{a,b} Marta Gómez-Perosanz,^{a,b} Pilar Escribano,^{a,b,c} Oscar Zaragoza,^e Emilio Bouza,^{a,b,c,d}
 Jesús Guinea^{a,b,c,d}

Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain^a; Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain^b; CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain^c; Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain^d; Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain^e

The echinocandins and liposomal amphotericin B are active against biofilm produced by echinocandin-susceptible *Candida* strains. However, few data have been reported on the production of biofilm by echinocandin-resistant isolates and their antifungal susceptibility. We studied the production of biofilm by *fks* mutant *Candida* strains and intrinsically echinocandin-resistant non-*Candida* isolates and the susceptibility of both entities to liposomal amphotericin B and echinocandins. We analyzed the production of biofilm by isolates from patients with fungemia (*fks* mutant *Candida*, $n = 5$; intrinsically echinocandin-resistant non-*Candida*, $n = 12$; and *Candida* wild type, $n = 10$). Biofilm formation was measured to classify strains according to biomass (crystal violet assay) and metabolic activity (XTT reduction assay). Preformed biofilms were tested against liposomal amphotericin B, caspofungin, micafungin, and anidulafungin. The sessile MIC was defined as the antifungal concentration yielding a 50% or 80% reduction in the metabolic activity of the biofilm compared to that of the growth control (SMIC₅₀ and SMIC₈₀, respectively). *fks* mutant *Candida* isolates formed biofilms in a fashion similar to that of *Candida* wild-type strains. The echinocandins had the highest activity against biofilms formed by wild-type *Candida* isolates, followed by *fks* mutant *Candida* isolates and non-*Candida* isolates. Liposomal amphotericin B had the highest activity against *fks* mutant *Candida* biofilms. The formation of biofilm by echinocandin-resistant strains was similar to that of wild-type strains, although resistance to echinocandins remained high.

Biofilm production allows *Candida* spp. to attach to catheters and other bioprosthetic devices, leading to catheter-related candidemia and complicating the management of patients with invasive candidiasis (1). *Candida* biofilms are difficult to eradicate because they are resistant to many antifungal agents and host immune mechanisms. In addition, associated infections increase morbidity and mortality rates (1–4). Echinocandins and liposomal amphotericin B are active against biofilm (5, 6), and patients with fungemia receiving these antifungal agents may not need early catheter removal (7).

Echinocandin resistance is increasingly frequent and complicates the management of patients with candidemia caused by *C. glabrata* (8). Resistance to echinocandins in *Candida* spp. is a consequence of mutations in the *fks* gene family (9–11). Other non-*Candida* species, such as *Trichosporon*, *Rhodotorula*, and *Saccharomyces*, rarely cause fungemia, although they are intrinsically resistant to echinocandins. Compared with wild-type *Candida* isolates, *fks* mutant *Candida* isolates and intrinsically echinocandin-resistant non-*Candida* isolates are thought to form biofilms that are highly resistant to echinocandins. In contrast, biofilms may be susceptible to liposomal amphotericin B regardless of their susceptibility to echinocandins. Only two studies have proved that *fks* mutant *Candida* isolates are able to form biofilms; however, very few isolates were tested (12) or only *fks* mutant *C. albicans* isolates were characterized (13). Little is known about the antifungal susceptibility of the biofilms formed by isolates belonging to non-*albicans Candida* species or intrinsically echinocandin-resistant non-*Candida* species to echinocandins or liposomal amphotericin B.

We characterized biofilm production, measured in terms of biomass production and metabolic activity, in clinical wild-type *Candida*, *fks* mutant *Candida*, and intrinsically echinocandin-resistant non-*Candida* strains. We also studied the antifungal susceptibility of these strains to echinocandins and liposomal amphotericin B.

(Results from this study were presented at the 7th Congress on Trends in Medical Mycology in Lisbon, Portugal, 2015 [14].)

MATERIALS AND METHODS

Organisms and identification. We studied 5 previously reported *fks* mutant *Candida* isolates (*Candida albicans*, $n = 1$; *Candida glabrata*, $n = 1$; *Candida tropicalis*, $n = 3$) (15, 16) (Table 1) and 10 wild-type *Candida* species isolates, 2 for each *fks* mutant isolate, matching the biofilm profile and species of the mutant isolates (*C. albicans*, $n = 2$; *C. glabrata*, $n = 2$; *C. tropicalis*, $n = 6$). In addition, we analyzed 12 intrinsically echinocandin-resistant non-*Candida* species (*Rhodotorula mucilaginosa*, $n = 7$; *Tricho-*

Received 22 December 2015 Returned for modification 8 March 2016

Accepted 21 March 2016

Accepted manuscript posted online 28 March 2016

Citation Marcos-Zambrano LJ, Gómez-Perosanz M, Escribano P, Zaragoza O, Bouza S, Guinea J. 2016. Biofilm production and antibiofilm activity of echinocandins and liposomal amphotericin B in echinocandin-resistant yeast species. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3579–3586. doi:10.1128/AAC.03065-15.

Address correspondence to Jesús Guinea, jguineaortega@yahoo.es.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Comparison of the antifungal activity of micafungin and amphotericin B against *Candida tropicalis* biofilms

Laura Judith Marcos-Zambrano^{1,2}, Pilar Escribano¹⁻³, Emilio Bouza¹⁻⁴ and Jesús Guinea^{1-4*}

¹Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ²Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ³CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES (CB06/06/0058), Madrid, Spain; ⁴Medicine Department, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

*Corresponding author. Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain. Tel: +34-915867163; Fax: +34-915044906; E-mail: jguineaortega@yahoo.es

Received 1 February 2016; returned 14 March 2016; revised 23 March 2016; accepted 7 April 2016

Objectives: *Candida tropicalis* is the fourth most common cause of candidaemia in hospitalized patients and associated mortality is high. *C. tropicalis* frequently causes biofilm-related infections. Echinocandins and amphotericin B show potent *in vitro* activity against *C. albicans* biofilms, but their activity against *C. tropicalis* biofilms has received little attention.

Methods: We studied production of biofilm by 54 *C. tropicalis* isolates from blood and the antifungal susceptibility of these isolates to micafungin, amphotericin B and liposomal amphotericin B. Biofilm production was measured using the crystal violet assay to determine biomass and the XTT reduction assay to determine metabolic activity. The antifungal susceptibility of planktonic and sessile cells was measured using the EUCAST EDef 7.2 procedure and XTT reduction assay, respectively. The sessile MIC endpoint of SMIC₈₀ was defined as an 80% reduction in the metabolic activity of the biofilm treated with the antifungal compared with the control well.

Results: The three drugs were very active against the isolates in planktonic form, with micafungin showing the highest activity ($P < 0.001$). Micafungin was the most active agent against *C. tropicalis* biofilms ($P < 0.001$). In contrast, liposomal amphotericin B showed poor antifungal activity.

Conclusions: Micafungin was the most active drug against *C. tropicalis* biofilm. Although the echinocandins and liposomal amphotericin B are considered very active against *Candida* spp. biofilms, this is not true for *C. tropicalis*, as liposomal amphotericin B showed poor antifungal activity against biofilms.

Introduction

Candida tropicalis is commonly responsible for candidaemia in patients with various types of malignancies. Infection is characterized by high mortality.^{1,2} *Candida* spp. attaches to plastic surfaces such as catheters to cause catheter-related candidaemia.³ Biofilm-related infections are difficult to eradicate, since colonized devices are a self-perpetuating source of infection and enhance antifungal resistance.⁴ *C. tropicalis* is no exception and up to 80% of isolates are highly biofilm-forming.⁵

Catheter removal is recommended in cases of proven or suspected catheter-related candidaemia.^{3,6} If removal is not feasible, an alternative approach could comprise systemic agents that are active against biofilm with(out) catheter lock therapy.⁷ Previous studies showed the potent *in vitro* antifungal activity of the three echinocandins—particularly micafungin—and amphotericin B against preformed *Candida* spp. biofilms.^{8,9} However, the activity of liposomal amphotericin B against *C. tropicalis* biofilms has received little attention.

Data on the antifungal susceptibility of planktonic cells of *C. tropicalis* have been reported,^{1,2} as have data on the antifungal susceptibility of the biofilms formed by this species.^{8,10} However, the number of *C. tropicalis* isolates tested in the form of biofilm is very limited. We report our findings on biofilm formation and the antifungal activity of micafungin, liposomal amphotericin B (AmBisome[®]) and amphotericin B against *C. tropicalis* biofilms preformed by isolates from blood. To our knowledge, this is the first report on a large collection of invasive *C. tropicalis* isolates and their antifungal susceptibility to micafungin and both forms of amphotericin B.

Materials and methods

Organisms

We studied 54 *C. tropicalis* isolates from blood cultures of 51 patients with candidaemia admitted to Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain, from January 2007 to December 2015. Strains were identified using the ID 32C