



Universitat Autònoma de Barcelona  
Facultat de Ciències  
Departament de Genètica i Microbiologia

*Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y  
*C. metapsilosis*: epidemiología de las candidemias,  
patrones de sensibilidad y mecanismos de  
resistencia a las equinocandinas

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universitat  
Autònoma de Barcelona.

**Mar Martí Carrizosa**

Tesis doctoral realizada bajo la dirección del Dr. Fernando Sánchez Reus en el Hospital  
de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona

Barcelona, 2015

Mar Martí Carrizosa

Dr. Fernando Sánchez Reus





Fernando Sánchez Reus, Profesor Asociado Médico del Departamento de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

**CERTIFICA:**

Que la presente tesis titulada “*Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*: **epidemiología de las candidemias, sensibilidad y mecanismos de resistencia a las equinocandinas**” que presenta Mar Martí Carrizosa para optar al grado académico de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona ha sido realizada bajo mi dirección y cumple con los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste y para los efectos oportunos firmo este documento en Barcelona,  
27 de Marzo del 2015

Dr. Fernando Sánchez Reus



*A mi familia*



Es difícil expresar con palabras lo agradecida que estoy con todas las personas que directa o indirectamente han participado en el desarrollo de esta tesis doctoral y que han hecho posible que esta etapa de mi vida, tan importante, ya esté finalizando.

A mi director de tesis, el Dr. Ferran Sánchez Reus, por confiar en mi en todo momento, por enseñarme, por apoyarme, por darme sus mejores consejos siempre que los he necesitado y por hacer posible esta tesis doctoral.

A la Dra. Francesca March, por haber compartido conmigo todo su conocimiento, por su dedicación e interés y por ayudarme en todo momento a nivel profesional y personal, porque sin su ayuda esta tesis doctoral no hubiera sido la misma.

Al Dr. Pere Coll, jefe del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, por haber permitido que iniciara esta tesis doctoral, y por haberme sentido respaldada en los momentos necesarios.

Al Dr. Ferran Navarro, por darme esta oportunidad y por haberme ayudado cuando lo he necesitado.

Al Prof. Neil AR Gow, responsable de mi estancia en el IMS (Institute of Medical Sciences) de la Universidad de Aberdeen (Escocia), y a la Dra. Jeanette Wagener, por darme la oportunidad de vivir una nueva experiencia, por permitirme realizar parte de mi proyecto doctoral dentro del grupo AFG (Aberdeen Fungal Group) y por compartir conmigo todo su conocimiento.

A la Dra. Emilia Cantón, del Servicio de Microbiología del Hospital Universitari i Politècnic la Fe de Valencia, por la gran cantidad de cepas que me ha cedido a lo largo de estos años, por su ayuda desinteresada y por la amabilidad y cercanía que ha demostrado siempre conmigo.

A la Dra. Beatriz Mirelis, por su amabilidad y por su ayuda desinteresada.

A Montse Español, porque ha sido la persona que me ha formado dentro del laboratorio y por su infinita paciencia a la hora de enseñarme.

A Carolyn Newey, por las correcciones en inglés y porque gracias a su paciencia ahora soy capaz de redactar un artículo científico.

A todos mis compañeros del laboratorio. A Eli y a Laura, por tenderme una mano siempre que la he necesitado. A Manel por la ayuda que me ha ofrecido y por los cafés y las largas charlas que hemos compartido. A la Dra. Noemí Alonso, a Marc A. y a Marc R., por compartir conmigo esta difícil experiencia, ya que sin ellos aún lo hubiera sido más. Y a todas las personas del Servicio de Microbiología, en especial a Cristina López, que siempre han tenido un hueco para ayudarme y por la amabilidad que han mostrado.

A Cris, por ser una excelente diseñadora y por ayudarme con la edición de la tesis.

A toda mi familia, en especial a mis padres, a mi hermana y a mi abuela, por que sin su apoyo hoy no estaría redactando estas tesis, porque siempre me han dado los mejores consejos en mis peores momentos y por estar siempre a mi lado. A mi madre en particular, porque siempre que he tenido que hacer presentaciones y charlas ha estado horas y horas escuchándome. Y a mi Golfi, la mejor perrita del mundo, que siempre estuvo a mi lado, haciéndome compañía durante todas las horas que he dedicado a la redacción de este documento.

A mis amigos, y en especial a Ehedei, por haber compartido conmigo esta experiencia, por las risas y los buenos momentos y por escucharme siempre que lo he necesitado.

A todos, gracias por hacer posible que esta etapa de mi vida haya sido tan especial, tanto a nivel profesional como a nivel personal.

ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>0. RESUMEN/ABSTRACT .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>1.1. Candidemia.....</b>  | <b>13</b> |
| 1.1.1. Incidencia .....  | 13        |
| 1.1.2. Distribución de especies de <i>Candida</i> .....  | 16        |
| 1.1.3. Factores de riesgo .....  | 17        |
| 1.1.4. Patogenia y manifestaciones clínicas .....  | 19        |
| 1.1.5. Mortalidad .....  | 20        |
| 1.1.6. Diagnóstico.....  | 21        |
| 1.1.7. Tratamiento antifúngico .....   | 24        |
| <b>1.2. <i>Candida parapsilosis complex</i> .....</b>  | <b>25</b> |
| 1.2.1. Generalidades .....   | 25        |
| 1.2.2. Diferenciación de las especies del complejo .....   | 26        |
| 1.2.3. Distribución .....  | 27        |
| 1.2.4. Factores de virulencia.....   | 28        |
| 1.2.5. Genética.....   | 28        |
| 1.2.6. Sensibilidad .....  | 29        |
| 1.2.7. Estudios de clonalidad .....  | 29        |
| <b>1.3. Las equinocandinas.....</b>  | <b>30</b> |
| 1.3.1. Mecanismo de acción y complejo $\beta$ -(1,3)-D-glucano sintetasa.....  | 32        |
| 1.3.2. Mecanismos de resistencia descritos en <i>Candida</i> .....   | 33        |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>  | <b>39</b> |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>3.1. Epidemiología de las fungemias en un Hospital Universitario a lo largo de 15 años: relevancia de <i>C. parapsilosis</i>, <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i>.....</b>   | <b>45</b> |
| 3.1.1. Estudio epidemiológico de las fungemias .....   | 45        |
| 3.1.2. Identificación molecular de <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i> .....   | 46        |
| <b>3.2. Estudio de sensibilidad en <i>C. parapsilosis</i>, <i>C. orthopsilosis</i>, <i>C. metapsilosis</i> y otras especies relevantes de <i>Candida</i>.....</b>  | <b>47</b> |
| 3.2.1. Estudio de sensibilidad <i>in vitro</i> frente a 9 agentes antifúngicos en <i>C. parapsilosis complex</i> causantes de fungemia (1997-2011).....  | 47        |
| 3.2.2. Cepas de <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> y otras especies relevantes de <i>Candida</i> empleadas en el análisis de sensibilidad <i>in vitro</i> y en el estudio de mecanismos de resistencia a las equinocandinas ..... | 49        |
| 3.2.3. Cepas control incluidas en el estudio de sensibilidad y de mecanismos de resistencia .....  | 50        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3. Resistencia a las equinocandinas en <i>C. parapsilosis complex</i> por modificación de la diana de acción: análisis de las regiones HS1 y HS2 de los genes <i>FKS1</i> y <i>FKS2</i> .....   | 50        |
| 3.4. Resistencia a las equinocandinas en <i>C. parapsilosis complex</i> por respuestas adaptativas al estrés: implicación de los niveles basales de quitina en la reducida sensibilidad a las equinocandinas y su modificación por la acción de la caspofungina.. | 52        |
| 3.4.1. Determinación de los niveles basales de quitina en las especies del complejo <i>C. parapsilosis</i> .....  | 52        |
| 3.4.2. Efecto de la caspofungina sobre el contenido de quitina basal presente en la pared celular.....  | 55        |
| 3.4.3. Análisis de la distribución de quitina en la pared celular.....  | 56        |
| 3.5. Estudio de clonalidad de aislados de <i>C. parapsilosis</i> : búsqueda de genotipos endémicos a lo largo de un periodo de 15 años.....   | 57        |
| 3.5.1. Cepas de <i>C. parapsilosis</i> incluidas en el estudio.....   | 58        |
| 3.5.2. Amplificación de los <i>loci</i> CP1, CP4, CP6 y B.....  | 58        |
| 3.5.2. Análisis de los fragmentos obtenidos.....  | 59        |
| 3.6. Análisis estadístico.....  | 60        |
| <br>  |           |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>   | <b>63</b> |
| 4.1. Epidemiología de las fungemias en un Hospital Universitario a lo largo de 15 años: relevancia de <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i> .....   | 65        |
| 4.1.1. Incidencia y distribución de las fungemias.....  | 65        |
| 4.1.2. Datos demográficos de los pacientes con candidemia.....  | 68        |
| 4.1.3. Identificación molecular de <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i> .....  | 69        |
| 4.2. Estudio de sensibilidad <i>in vitro</i> en <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> y otras especies relevantes de <i>Candida</i> .....   | 70        |
| 4.2.1. Estudio de la de sensibilidad <i>in vitro</i> frente a 9 agentes antifúngicos en aislados de <i>C. parapsilosis complex</i> causantes de fungemia (1997-2011).....   | 70        |
| 4.2.2. Patrón de sensibilidad a las equinocandinas en aislados de <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> .....   | 71        |
| 4.2.3. Patrón de sensibilidad a las equinocandinas en otras especies del género <i>Candida</i> incluidas en el estudio.....   | 72        |
| 4.3. Resistencia a las equinocandinas en <i>C. parapsilosis complex</i> por modificación de la diana de acción: análisis de las regiones HS1 y HS2 de los genes <i>FKS1</i> y <i>FKS2</i> .....   | 75        |
| 4.3.1. <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> .....  | 75        |
| 4.3.2. Otras especies del género <i>Candida</i> incluidas en el estudio.....  | 79        |
| 4.4. Resistencia a las equinocandinas en <i>C. parapsilosis complex</i> por respuestas adaptativas al estrés: implicación de los niveles basales de quitina en la reducida sensibilidad a las equinocandinas y su modificación por la acción de la caspofungina.. | 82        |
| 4.4.1. Comparación de los niveles basales de quitina en las especies del complejo <i>C. parapsilosis</i> .....  | 82        |
| 4.4.2. Efecto de la caspofungina sobre el contenido de quitina basal presente en la pared celular.....  | 85        |
| 4.4.3. Análisis de la distribución de la quitina en la pared celular antes y después del tratamiento con caspofungina.....  | 87        |
| 4.5. Estudio de clonalidad de aislados de <i>C. parapsilosis</i> : búsqueda de genotipos endémicos a lo largo de un periodo de 15 años.....   | 91        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>5. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>95</b>  |
| 5.1. Incidencia, distribución y perfiles de sensibilidad antifúngica de <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i> a lo largo de 15 años en un hospital universitario .....    | 97         |
| 5.2. Estudio de sensibilidad a las equinocandinas en <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> y otras especies relevantes de <i>Candida</i> .....                            | 101        |
| 5.3. Identificación de mutaciones en los genes <i>FKS</i> responsables de la resistencia adquirida a las equinocandinas en <i>C. parapsilosis</i> y otras especies de <i>Candida</i> .....                    | 103        |
| 5.4. Implicación de los niveles basales de quitina en la reducida sensibilidad intrínseca y adquirida a las equinocandinas en <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i> ..... | 109        |
| 5.5. Detección de un genotipo endémico de <i>C. parapsilosis</i> .....  | 112        |
| <br>  |            |
| <b>6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....</b>   | <b>115</b> |
| <br>  |            |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>  | <b>123</b> |
| <br>  |            |
| <b>8. ANEXO I: COMPENDIO DE PUBLICACIONES.....</b>  | <b>147</b> |
| 8.1. Fungemia in a Spanish hospital: the role of <i>Candida parapsilosis</i> over a 15-year period .....  | 149        |
| 8.2. Implication of <i>Candida parapsilosis FKS1</i> and <i>FKS2</i> mutations in reduced echinocandin susceptibility ( <i>In press</i> ).....  | 157        |
| <br>  |            |
| <b>9. ANEXO II: COMUNICACIONES A CONGRESO .....</b>   | <b>167</b> |
| <br>  |            |
| <b>10. ANEXO III: TRATAMIENTO DE LA CANDIDIASI INVASIVA .....</b>   | <b>171</b> |
| <br>  |            |
| <b>11. ANEXO IV: MUTACIONES DESCRITAS EN Fks1p Y Fks2p .....</b>  | <b>179</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Morfología colonial de las 3 especies del complejo *C. parapsilosis* en CHROMagar Candida.

**Figura 2.** Estructura química de las equinocandinas.

**Figura 3.** Estructura de la pared celular de candida.

**Figura 4.** Mecanismo de acción de las equinocandinas.

**Figura 5.** Mecanismos de resistencia descritos en candida frente a las equinocandinas.

**Figura 6.** Panel colorimétrico Sensititre YeastOne SYO-10.

**Figura 7.** Curvas estándar de calibración de la glucosa, manosa y glucosamina.

**Figura 8.** Análisis de los fragmentos amplificados de los *loci* CP1, CP4 y CP6.

**Figura 9.** Modelo topográfico de Fks1p de *C. parapsilosis* con las respectivas mutaciones identificadas en este estudio, utilizando como plantilla el modelo topográfico de Fks1p de *S. cerevisiae*.

**Figura 10.** Porcentaje de quitina basal presente en la pared celular de los 18 aislados de *C. parapsilosis complex* analizados y la cepa control.

**Figura 11.** Porcentaje de quitina basal (barras lilas) y después de un tratamiento con caspofungina (barras azules) respecto al total de carbohidratos detectados mediante HPLC de las cepas de *C. parapsilosis complex* y la cepa control.

**Figura 12.** Porcentaje de glucano basal (barras lilas) y después de un tratamiento con caspofungina (barras azules) respecto al total de carbohidratos detectados mediante HPLC de las cepas de *C. parapsilosis complex* y la cepa control.

**Figura 13.** Distribución de la quitina sobre la pared celular en aislados de *C. parapsilosis complex* y la cepa control de *C. albicans*.

**Figura 14.** Distribución de la quitina sobre la pared celular de la cepa AM2005/0301 de *C. metapsilosis*.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Tabla 1.** Incidencia de la candidemia reportada en diferentes países.
- Tabla 2.** Secuencia nucleotídica de los iniciadores utilizados en este estudio.
- Tabla 3.** Distribución por especies de los 360 aislados de hemocultivos causantes de fungemia en los 343 pacientes diagnosticados en el Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau de Barcelona entre 1997 y 2011.
- Tabla 4.** Distribución de las especies de *Candida* por grupos de edad.
- Tabla 5.** Resultados del análisis de sensibilidad *in vitro* de los 68 aislados de *C. parapsilosis complex* frente a 9 agentes antifúngicos.
- Tabla 6.** Resultados del estudio de sensibilidad *in vitro* a las equinocandinas de las siete especies de *Candida*.
- Tabla 7.** Secuencia de aminoácidos *wild type* de las regiones HS1 y HS2 de Fks1p y Fks2p de las 3 especies del complejo *C. parapsilosis*.
- Tabla 8.** Resultados del estudio de sensibilidad *in vitro* frente a las 3 equinocandinas de las cepas de *C. parapsilosis* no sensibles a alguna equinocandina, y de las cepas que presentaron mutación en Fks1p.
- Tabla 9.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la Fks1p de 7 especies de *Candida* y de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Tabla 10.** Resultados del estudio de sensibilidad *in vitro* frente a las 3 equinocandinas y del análisis de las regiones HS1 y HS2 de Fks1p en 4 aislados clínicos de *C. orthopsilosis* y en 3 de *C. metapsilosis*.
- Tabla 11.** Resumen de los resultados obtenidos en el estudio de sensibilidad y descripción de las mutaciones detectadas en Fks1p y Fks2p de las cepas de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. albicans* y *C. tropicalis* incluidas en el estudio.
- Tabla 12.** Secuencia de aminoácidos *wild type* de las regiones HS1 y HS2 de Fks1p y Fks2p de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. albicans* y *C. tropicalis*.
- Tabla 13.** Resultados obtenidos del estudio del contenido basal de carbohidratos presentes en la pared celular, así como del estudio de sensibilidad *in vitro* de las cepas de *C. parapsilosis complex* incluidas en este estudio y de la cepa control.
- Tabla 14.** Resultados del análisis de tipificación de 26 aislados de *C. parapsilosis*.

## ABREVIATURAS

5FC: 5-flucitosina.

ABC transporters: *ATP-binding cassette transporters*.

AFG: Anidulafungina.

AMB: Anfotericina B.

ATCC: *American Type Culture Collection*.

BSI: *Blood stream infections*.

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*.

CFG: Caspofungina.

CFW: Calcofluor blanco.

CHS: *Chitin synthase*.

CI: Candidiasis invasiva.

CIM: Concentración inhibitoria mínima.

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

DDDs: Dosis diaria definida.

dH<sub>2</sub>O: Agua destilada.

DIC: *Differential interference contrast*.

DNA: *Deoxyribonucleic acid*. Ácido desoxirribonucleico.

dNTPs: *Deoxynucleotide triphosphates*.

DO: Densidad óptica.

ECVs: *Epidemiological Cut-off Values*. Puntos de corte epidemiológicos.

EPINE: Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España.

ESCMID: *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease*.

EUA: Estados Unidos de América.

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.

FDA: *Food and Drug Administration*.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FLC: Fluconazol.

GS: Glucano sintetasa.

HOG: *High-osmolarity glycerol*.

HPAEC: *High-performance anion-exchange chromatography*.

HPLC: *High performance liquid chromatography*.

HS: *Hot spot*.

- IDSA: *Infectious Disease Society of America*.
- ITC: Itraconazol.
- ITS: *Internal transcribed spacer*.
- MALDI-TOF: *Matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight*.
- MFG: Micafungina.
- MG: Media geométrica.
- MLST: *Multilocus sequence typing*.
- pb: pares de bases.
- PBS: *Phosphate buffered saline*.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- PD: Poder discriminatorio.
- PKC: *Protein Kinase C*.
- POS: Posaconazol.
- RAPD: *Randomly amplified polymorphic DNA*.
- RES: *Reduced echinocandin susceptibility*. Reducida sensibilidad a las equinocandinas.
- RFLP: *Restriction fragment length polymorphism*.
- rpm: Revolución por minuto.
- RNA: *Ribonuclei acid*. Ácido ribonucleico.
- SDD: Sensible dosis dependiente.
- SDS: Dodecil sulfato de sodio.
- SNP: *Single nucleotide polymorphism*. Polimorfismo de un solo nucleótido.
- STR: *Short tandem repeats*.
- UCI: Unidad de cuidados intensivos.
- UCIN: Unidad de cuidados intensivos neonatales.
- VRC: Voriconazol.
- WGA: *Wheat Germ Agglutinin*.
- WT: *Wild type*.
- YPD: *Agar Yeast Extract-Peptone-Dextrose*.



## **0. RESUMEN/ABSTRACT**

---



**RESUMEN**

*Candida parapsilosis* es el agente causal de un gran número de infecciones fúngicas y está considerado uno de los agentes más frecuentes de fungemia. Su incidencia ha ido incrementando en las últimas décadas y, en la actualidad, es después de *C. albicans* la especie predominante causante de candidemia en Europa, Asia y América del Sur, especialmente en la población pediátrica en la que puede llegar a superar a *C. albicans*.

*C. parapsilosis* es un complejo que hasta el año 2005 se creía formado por 3 grupos (I, II, III), pero que en la actualidad se ha demostrado que está formado por tres especies distintas, *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, a las que se les ha atribuido diferente patogenicidad y diferencias en los perfiles de sensibilidad a antifúngicos.

El complejo *C. parapsilosis* presenta intrínsecamente una sensibilidad reducida a las equinocandinas, por lo que está discutido el valor de estos antifúngicos en el tratamiento de las candidemias por *C. parapsilosis*, a pesar de que las equinocandinas (casposfungina, anidulafungina y micafungina) son actualmente empleados como terapia de primera línea en más del 60% de la candidemias. Los estudios epidemiológicos, el patrón de sensibilidad de este complejo y, particularmente, los mecanismos implicados en la resistencia, intrínseca o adquirida, de *C. parapsilosis complex* a las equinocandinas, han sido poco estudiados.

En el trabajo que se presenta, se realizó un estudio retrospectivo analizando las candidemias diagnosticadas a lo largo de 15 años en el servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. Se evaluó la implicación del complejo *C. parapsilosis* como agente causal de candidemia, su distribución porcentual según las otras especies de *Candida* y en función de la edad del paciente, así como su evolución a lo largo de los años y la prevalencia de las tres especies del complejo: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. También se estudió la sensibilidad de *C. parapsilosis* frente a los nueve antifúngicos de uso sistémico actualmente aprobados y se analizaron los posibles mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a las equinocandinas.

A lo largo del periodo de 15 años evaluado, *C. parapsilosis complex* resulto ser la segunda especie más frecuente causante de fungemia en nuestro hospital (20%), por delante de *C. tropicalis* (14,4%) y *C. glabrata* (11,7%) y solo por detrás de *C. albicans* (43,1%), con una incidencia mucho más elevada en los pacientes pediátricos ( $\leq 1$  año: 66.7%; 2-14 años: 50%). Durante este periodo, y al igual que se observó en otras especies mayoritarias de *Candida* no-*C. albicans*, la incidencia de *C. parapsilosis* aumentó ligeramente a lo largo de los años (0,33% por año).

Dentro del complejo *C. parapsilosis*, la gran mayoría de las cepas correspondían a *C. parapsilosis* (98,5%), siendo extremadamente baja la frecuencia de *C. orthopsilosis* (1.5%) y nula la de *C. metapsilosis*

Los estudios de sensibilidad mostraron una excelente actividad de los 9 antifúngicos evaluados frente a la gran mayoría de los aislados de *C. parapsilosis*, y solo en el caso del itraconazol se detectó un porcentaje considerable de cepas no sensibles (23%). En el caso de las equinocandinas, el porcentaje de cepas no sensibles a lo largo de los 15 años fue bajo (1,5%), y fue la caspofungina la equinocandina más eficaz frente a *C. parapsilosis*.

Para estudiar los mecanismos de resistencia a las equinocandinas se analizaron los genes *FKS1* y *FKS2*, que codifican para la  $\beta$ -(1,3)-D-glucano sintetasa, en busca de mutaciones puntuales que pudiesen comportar cambios en ésta, la diana de acción de las equinocandinas. También se analizó la posible activación de respuestas adaptativas o de compensación frente a estímulos externos estresantes para la célula, como podría ser el incremento de la síntesis de quitina de la pared celular debido a la inhibición de la síntesis del  $\beta$ -(1,3)-D-glucano causada por las equinocandinas.

Con respecto a las mutaciones, se detectó una frecuencia relativamente baja de mutaciones adquiridas en el gen *FKS1* de los aislados de *C. parapsilosis* (11/78 aislados), tanto sensibles como no sensibles a las equinocandinas, todas localizadas fuera de la región HS y no se identificó ninguna mutación en el gen *FKS2*. Solo se identificó una única mutación (F1386S) en uno de los 6 aislados no sensibles, fuera de la región HS, que podría estar asociada con el fenotipo de resistencia a las equinocandinas.

En lo que hace referencia a la quitina, se observó que el contenido basal de quitina presente en la pared celular era muy similar en los aislados de *C. parapsilosis* sensibles (7,79%) y no sensibles (8,14%) a las equinocandinas, como también lo era en las tres especies del complejo: *C. parapsilosis* (7,96%), *C. orthopsilosis* (9,42%) y *C. metapsilosis* (9,53%), pero todos estos valores eran notablemente superiores a los determinados en la cepa control de *C. albicans* (4,61%).

Al analizar el efecto de la caspofungina sobre el contenido en quitina de la pared celular en las especies del complejo *C. parapsilosis* se observó que la gran mayoría de aislados incrementaron el contenido basal de quitina entre un 1 y un 3%, a excepción de los dos aislados de *C. parapsilosis* con mayor resistencia a las equinocandinas, que incrementaron su contenido de quitina en un 7 y un 11%. Cabe destacar, que estos dos aislados fueron los que mostraron los niveles basales de quitina más bajos y uno de ellos presentó la mutación F1386S. Estos resultados podrían sugerir una respuesta compensatoria de incremento en la producción de quitina, como consecuencia de la inhibición de la síntesis del  $\beta$ -(1,3)-D-glucano causada por las equinocandinas, que podría estar implicada en los mecanismos de resistencia adquirida a estos antifúngicos.



**ABSTRACT**

*Candida parapsilosis* is the causal agent of a great number of fungal infections and it is considered one of the most common agents causing fungemia. Its incidence has been increasing during the last decades, and nowadays is, after *C. albicans*, the predominant species causing candidemia in Europe, Asia and South America, especially in the paediatric population group in which it can surpass *C. albicans*.

*C. parapsilosis* is a complex that up to 2005 was believed to be comprised of 3 groups (I, II, III). However at present it has been demonstrated that it is comprised of 3 distinct species: *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*, which have been attributed to different levels of pathogenicity and differences in the susceptibility patterns to antifungals.

The *C. parapsilosis complex* isolates show an intrinsic reduced susceptibility to echinocandins, and so the value of these antifungal agents in the treatment of candidemias caused by *C. parapsilosis* is discussed, although echinocandins (caspofungin, anidulafungin and micafungin) are nowadays used as first line therapy in more than 60% of candidemias. Epidemiological studies, susceptibility patterns of this complex, and particularly, the mechanisms implied in the resistance, both intrinsic and acquired, of *C. parapsilosis complex* to echinocandins, have been poorly studied.

In the study presented, a retrospective study was carried out in which the diagnosed candidemias were analysed over a 15-year period in the Microbiology Service of the *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* in Barcelona. The implication of *C. parapsilosis complex* as a causal agent of candidemia was evaluated, and also their percentage distribution according to other *Candida* species and their prevalence according to patient's age, as well as their evolution over the years and the prevalence of the three species comprising the complex: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. The susceptibility of *C. parapsilosis* to the nine antifungal approved systemic agents and their possible resistance mechanism, both intrinsic and acquired, to echinocandins was also studied.

Over the 15-year period evaluated, *C. parapsilosis complex* was the second most common specie causing fungemia in our hospital (20%), ahead of *C. tropicalis* (14.4%) and *C. glabrata* (11.7%) and only behind *C. albicans* (43.1%). A much higher incidence is shown in paediatric patients ( $\leq 1$  year: 66.7%; 2-14 year: 50%). During this period and, as it has been observed in other common *Candida* non- *C. albicans* species, the incidence of *C. parapsilosis* increased slightly over the years (0.33% per year).

Within the *C. parapsilosis complex*, the vast majority of strains corresponded to *C. parapsilosis* (98.5%), the frequency of *C. orthopsilosis* being extremely low (1.5%) and the frequency of *C. metapsilosis* being nil.

The susceptibility studies showed an excellent activity against almost all *C. parapsilosis* isolates in the nine antifungal agents tested, and only in the case of itraconazole, a considerable percentage of non-susceptible strains (23%) was detected. In the case of echinocandins, the percentage of non-susceptible strains over the 15-year period was low (1.5%) and caspofungin was the most active echinocandin against *C. parapsilosis*.

To study the resistance mechanism against echinocandins, the *FKS1* and *FKS2* genes were analysed, which codify for the  $\beta$ -(1,3)-D-glucan synthase, looking for point mutations that could imply changes in this enzyme, the target of action of echinocandins. The possible activation of adaptive or compensatory responses against stressful external stimuli for the cell was also analysed, such as might be the increase in chitin synthesis of the cell wall due to inhibition of the synthesis of the  $\beta$ -(1,3)-D-glucan caused by echinocandins.

Regarding mutations, a relative low frequency of acquired mutations in the *FKS1* gene in *C. parapsilosis* isolates (11/78 isolates) was detected, both in echinocandin susceptible and non susceptible isolates. All mutations were detected outside HS regions and no mutations were identified in the *FKS2* gene. Only a single mutation (F1386S) in 1 out 6 non-susceptible isolates was identified, outside the HS regions, which may be associated with the phenotype resistant to echinocandins.

Regarding the chitin levels, it was observed that the basal chitin content present in the cell wall was very similar among the echinocandin susceptible (7.79%) and non-susceptible (8.14%) *C. parapsilosis* isolates, as well as among the 3 species of the complex: *C. parapsilosis* (7.96%), *C. orthopsilosis* (9.42%) and *C. metapsilosis* (9.53%). However all these values were significantly higher than those determined in the *C. albicans* control strains (4.61%).

When analysing the effect of caspofungin in the cell wall chitin content in the *C. parapsilosis complex* strains, it was observed that the vast majority of the strain increased their basal chitin content between 1% to 3%, with the exception of the two echinocandin resistant *C. parapsilosis* isolates that increased their chitin content by 7% and 11%. Of note is that these two isolates were the ones that showed the lowest basal chitin content and moreover, one of them showed the F1386S mutation. These results may suggest that a compensatory increase in the chitin production, as a consequence of the inhibition in the synthesis of  $\beta$ -(1,3)-D-glucan caused by echinocandins, could be implied in the acquired resistance to these antifungal agents.



## **1. INTRODUCCIÓN**

---



## 1.1. Candidemia

Las infecciones fúngicas invasivas son un problema de relevancia creciente en las instituciones sanitarias (1,2) debido especialmente a un aumento significativo del número de casos de infecciones del torrente sanguíneo causadas por hongos, o fungemias. Dicho incremento ha ido en paralelo al incremento de los pacientes a riesgo, y parece estar asociado a diferentes factores, entre ellos el aumento de pacientes que presentan alguna deficiencia en el sistema inmunitario, el incremento de procedimientos invasivos que acompaña a los grandes avances de la tecnología médica, y el uso generalizado de antibioticoterapia de amplio espectro en pacientes hospitalizados (3–5). Pero también es debido a una mayor probabilidad de supervivencia de los pacientes graves, incrementando así el número de pacientes a riesgo de desarrollar una infección, y el número de los que después de superar una infección bacteriana pueden desarrollar una infección fúngica invasiva.

Se entiende por candidemia la fungemia causada por especies del género *Candida*, y es la causa más frecuente de infección fúngica invasiva.

### 1.1.1. Incidencia

Las especies del género *Candida* constituyen, en orden de frecuencia, el cuarto grupo más común de agentes causantes de infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo (*Blood Stream Infections*; BSI) tanto en los Estados Unidos de América (EUA) (6,7) como en Europa (8), oscilando entre el 5% y el 8%. Aunque este porcentaje varía cuando se estratifica la frecuencia de las BSI en función del servicio clínico, siendo más frecuente en las unidades de cuidados intensivos y en los servicios de cirugía digestiva, pediatría y urología (9).

En España, la frecuencia de las candidemias se sitúa por debajo de la detectada en los EUA, encontrándose alrededor del 5%. En un estudio llevado a cabo entre los años 1990 y 1999 dentro del programa EPINE (Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España), *Candida* se situó en el quinto lugar como agente infeccioso causante de septicemia (10). En otro estudio desarrollado por Ortega *et al.* (2011), en el Hospital Clínic de Barcelona entre los años 1991-2008, se observó que el

5% de las infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo fueron causadas por *Candida*, siendo la séptima causa de infección nosocomial (11).

Desde la década de los 70, muchos artículos tanto europeos como estadounidenses han reportado un incremento importante en la incidencia de las fungemias, particularmente de las candidemias (7,12–18), aunque en los últimos años este incremento no ha sido tan pronunciado como el detectado en años anteriores (2,19,20).

Es difícil estimar la incidencia actual de la candidemia ya que depende de la población estudiada y difiere mucho entre países, o incluso entre estudios llevados a cabo en un mismo país. La Tabla 1 muestra algunas de las más recientemente publicadas tasas de incidencia de candidemia en distintos países de los 5 continentes. Éstas, varían entre 1,81 casos/100.000 habitantes en Australia y 26,2 casos/100.000 habitantes en Baltimore, o de 0,33 casos/1.000 admisiones en Chile y 2,37 casos/1.000 admisiones en Italia. Varios son los factores que podrían explicar esta variabilidad entre países. Entre éstos están los asociados a la naturaleza de los diferentes estudios, como por ejemplo el número de instituciones participantes en el estudio, la inclusión de grupos de pacientes que puedan presentar un mayor riesgo de padecer candidemia, ya sea debido a la gravedad de la enfermedad subyacente o incluso a la edad del paciente, o a la actividad médica desarrollada en el centro. En un estudio de Arendrup *et al.* en el que participaron 6 departamentos de microbiología clínica (atendiendo 1/3 parte de la población danesa) a lo largo un periodo de 6 años, se observó que la incidencia de la candidemia variaba significativamente en función de la edad y del sexo de los pacientes (21). Resultados similares se observaron en un estudio multicéntrico llevado a cabo en España a lo largo de 13 meses, en el marco del grupo de estudio FUNGEMYCA, detectándose un mayor número de casos de fungemia en pacientes de edad avanzada (46,4%) (22).

**Tabla 1.** Incidencia de la candidemia reportada en diferentes países.

| Continente | País        | Periodo estudio            | Tipo de estudio              | Ámbito de estudio           | Hospitales participantes                 | Incidencia                                     | Referencia                                |
|------------|-------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|--|--|---|
| América    | Canadá      | 01/07/99-30/06/04          | Poblacional                  | Regional (Calgary)          | 4  | 2,9 casos candidemia/100.000 habitantes        | Laupland <i>et al.</i> (2005) (23)        |
|            | EUA         | 01/01/04-31/12/07          | Retrospectivo                | Hospital Universitario Iowa | 1  | 1,5 casos candidemia /10.000 pacientes/día     | Diekema <i>et al.</i> (2012) (24)         |
|            | EUA         | 01/03/08-28/02/11          | Poblacional                  | Regional (Atlanta)          | 25                                       | 13,3 casos candidemia/100.000 habitantes       | Cleveland <i>et al.</i> (2012) (25)       |
|            | EUA         | 01/03/08-28/02/11          | Poblacional                  | Regional (Baltimore)        | 15                                       | 26,2 casos candidemia /100.000 habitante       | Cleveland <i>et al.</i> (2012) (25)       |
|            | Honduras    | 11/08 - 10/10              | Multicéntrico, prospectivo   | Nacional                    | ND <sup>a</sup>                          | 0,90 casos candidemia/1.000 admisiones         | Nucci <i>et al.</i> (2013) (26)           |
|            | Venezuela   | 11/08-10/10                | Multicéntrico, prospectivo   | Nacional                    | ND                                       | 1,72 casos candidemia/1.000 admisiones         | Nucci <i>et al.</i> (2013) (26)           |
|            | Colombia    | 11/08-10/10                | Multicéntrico, prospectivo   | Nacional                    | ND                                       | 1,96 casos candidemia/1.000 admisiones         | Nucci <i>et al.</i> (2013) (26)           |
|            | Ecuador     | 11/08-10/10                | Multicéntrico, prospectivo   | Nacional                    | ND                                       | 0,90 casos candidemia/1.000 admisiones         | Nucci <i>et al.</i> (2013) (26)           |
|            | Chile       | 11/08-10/10                | Multicéntrico, prospectivo   | Nacional                    | ND                                       | 0,33 casos candidemia/1.000 admisiones         | Nucci <i>et al.</i> (2013) (26)           |
|            | Brasil      | 11/08-10/10                | Multicéntrico, prospectivo   | Nacional                    | ND                                       | 1,38 casos candidemia/1.000 admisiones         | Nucci <i>et al.</i> (2013) (26)           |
|            | Argentina   | 11/08-10/10                | Multicéntrico, prospectivo   | Nacional                    | ND                                       | 1,95 casos candidemia/1.000 admisiones         | Nucci <i>et al.</i> (2013) (26)           |
| Europa     | Islandia    | 01/01/00-31/12/11          | Multicéntrico                | Nacional                    | 14                                       | 4,4 casos candidemia /100.000 habitantes       | Asmundsdottir <i>et al.</i> (2013) (27)   |
|            | Reino Unido | 01/03/05-28/02/06          | Multicéntrico                | Regional (Escocia)          | ND                                       | 4,8 casos candidemia /100.000 habitantes       | Odds <i>et al.</i> (2007)(28)             |
|            | Dinamarca   | 2010-2011                  | Multicéntrico, prospectivo   | Nacional                    | 13                                       | 10,05 casos fungemia /100.000 habitantes(2011) | Arendrup <i>et al.</i> (2013) (19)        |
|            | Alemania    | 1/06- 12/11                | Multicéntrico                | Nacional                    | 682 UCI                                  | 0,08 fungemias / 1,000 pacientes /día (2011)   | Meyer <i>et al.</i> (2013) (8)            |
|            | Suecia      | 01/09/05-31/08/06          | Prospectivo, observacional   | Nacional                    | 28                                       | 4,2 casos candidemia /100.000 habitantes       | Ericsson <i>et al.</i> (2012) (29)        |
|            | Finlandia   | 01/04- 12/07               | Multicéntrico                | Nacional                    | ND                                       | 2,86 casos candidemia /100.000 habitantes      | Poikonen <i>et al.</i> (2010)(30)         |
|            | España      | 05/10- 04/11               | Multicéntrico, Prospectivo   | Nacional                    | 29                                       | 8,1 casos candidemia /100.000 habitantes       | M. Puig-Asensio <i>et al.</i> (2013) (31) |
|            | España      | 1/1/09-31/1/10             | Multicéntrico, Prospectivo   | Nacional                    | 44                                       | 0,92 casos fungemia/1.000 admisiones (2009)    | Pemán <i>et al.</i> (2012) (22)           |
|            | España      | 2000-2009                  | Retrospectivo                | Regional (Madrid)           | 1  | 1,52 casos candidemias/1.000 admisiones (2009) | Fortún <i>et al.</i> (2012) (20)          |
|            | España      | 01/10/05-31/09/06          | Prospectivo                  | Regional (Andalucía)        | 16                                       | 0,80 casos candidemia/10.000 pacientes/día     | Rodríguez <i>et al.</i> (2011) (32)       |
|            | Italia      | 01/08- 12/10               | Prospectivo                  | Hospital universitario      | 1  | 2,37 casos candidemia/1.000 admisiones         | Bassetti <i>et al.</i> (2011) (33)        |
| Grecia     | 2005-2009   | Prospectivo, observacional | Nacional                     | 5 PICU                      | 6,4 casos de candidemia/1.000 admisiones | Vogiatzi <i>et al.</i> (2013)(34)              |   |
| África     | Sud África  | 1990-2007                  | Retrospectivo                | Regional (Soweto)           | 1  | 3,6 casos candidemia/100.000                   | Kreusch <i>et al.</i> (2013) (35)         |
| Asia       | China       | 01/09-12/11                | Retrospectivo, observacional | Jinling Hospital            | 1  | 0,85 casos de candidemia/100.000               | Ma <i>et al.</i> (2013) (36)              |
| Oceanía    | Australia   | 08/01- 07/04               | Prospectivo                  | Multicéntrico               | 1  | 1,81 casos de candidemia/100.000               | Chen <i>et al.</i> (2006)(37)             |

<sup>a</sup> No Disponible.

UCI, Unidades de Cuidados Intensivos; PICU, Unidades de Cuidados Intensivos de Pediatría.

### 1.1.2. Distribución de especies de *Candida*

El género *Candida* está constituido por más de 150 especies, de las cuales hasta la actualidad, tan solo una veintena ha mostrado tener importancia clínica por su capacidad para infectar al hombre, y entre ellas 5: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, son responsables de más del 90% de las candidemias.

*C. albicans* ha sido y es actualmente la especie más comúnmente aislada como agente causante de candidemia en la mayoría de países del mundo, oscilando entre el 11.5% de Turquía o el 32% de México y Taiwán y hasta más de un 60% en Austria o Suecia (38). No obstante, en la última década, estudios realizados en diferentes regiones del mundo, muestran cambios epidemiológicos en la distribución de las especies que causan candidemia con mayor frecuencia, con una disminución de las candidemias causadas por *C. albicans* y un aumento exponencial de las candidemias causadas por especies no-*albicans*. (39–42)

*C. glabrata* es la segunda especie más común causante de candidemia en los EUA y en los países nórdicos, por detrás de *C. albicans* y por delante de *C. parapsilosis* (30,41,43). Por el contrario, en Europa, Asia y América del Sur, *C. parapsilosis* es la segunda especie más comúnmente identificada como agente causante de candidemia, llegando a ser en algunos países la especie más frecuentemente aislada (44,45), mientras que *C. glabrata* suele situarse en tercer o cuarto lugar.

Esta variación geográfica de la distribución de las especies causantes de candidemia puede ser causa de diferentes factores asociados, como la edad de los pacientes, la enfermedad de base (en especial las neoplasias) y los tratamientos previos con azoles.

La frecuencia de *C. parapsilosis* en pacientes pediátricos es muy elevada, y aunque la mayoría de los estudios la sitúan en segundo lugar por detrás de *C. albicans* (tanto en neonatos como en menores de 18 años) (19,26,46) existen estudios en los que es la especie más común (1,47). En un trabajo reciente realizado en España con

pacientes pediátricos, *C. parapsilosis* representó el 43% del total de las candidemias siendo la causa más común (48).

Por otra parte, *C. glabrata* es más frecuente en la población de edad avanzada (27), aunque se postula que este hecho podría deberse a un mayor grado de exposición previa a los azoles, ya sea durante tratamientos médicos o exposición vía alimentación, consecuencia del incremento en el uso de azoles como plaguicidas (49).

El uso del fluconazol parece favorecer la selección positiva de especies potencialmente resistentes a los azoles, como *C. glabrata* y *C. krusei*. Así se demostró en un estudio llevado a cabo en Finlandia entre los años 2004 y 2007 (30), en el cual se observó que el incremento de los casos de *C. glabrata* iba paralelo al incremento del uso de fluconazol. Los autores compararon sus resultados con los de otro estudio suyo previo (1995-1999) (50) y observaron como las candidemias por *C. glabrata* aumentaban del 10% al 19%, al mismo tiempo que la DDDs (Dosis Diaria Definida) de fluconazol/100.000 habitantes pasaba de 19.57 en el año 2000 a 25.09 en el 2007, consecuencia del empleo rutinario de fluconazol profiláctico en neonatos prematuros, pacientes con leucemia aguda y pacientes trasplantados de hígado. No obstante, en otros estudios no han hallado que exista una correlación directa unifactorial entre el uso de fluconazol y el incremento en la frecuencia de *C. glabrata* (51).

También existen estudios que asocian el uso de determinados antibióticos, algunas enfermedades de base o determinados procesos invasivos, con el desarrollo de candidemias por especies concretas. Así por ejemplo, se ha asociado el uso previo de piperacilina-tazobactam y vancomicina con candidemias por *C. glabrata* y *C. krusei* (52), la diabetes con *C. tropicalis* (53,54) y la cirugía torácica y abdominal con *C. guilliermondii* (53).

### **1.1.3. Factores de riesgo**

Conocer los factores riesgo que contribuyen al desarrollo de la candidemia es crucial para poder prevenir esta enfermedad y determinar de una forma más temprana

los pacientes que pueden desarrollarla, iniciando precozmente tratamientos más eficaces.

Son tres los factores que contribuyen de un modo especial al desarrollo de una candidemia:

1. Factores que incrementan la colonización por *Candida*, ya sea de origen endógeno o exógeno.

- Uso de antibióticos de amplio espectro: El uso prolongado de antibióticos de amplio espectro es un factor de riesgo endógeno de padecer candidemia, ya que las terapias prolongadas con antibióticos reducen la microbiota bacteriana, permitiendo un incremento excesivo de *Candida* en las mucosas (4,55)(52).
- Hospitalización prolongada: La prolongación de la estancia hospitalaria es un factor de riesgo exógeno, ya que aumenta la probabilidad de que el paciente adquiera una infección por *Candida* procedente de los trabajadores de la salud así como del centro hospitalario, en especial en las infecciones causadas por *C. parapsilosis* (56–58).

2. Alteraciones de la integridad de las barreras

- Nutrición parenteral: La nutrición parenteral, tanto total como periférica, ha sido descrita como factor de riesgo muy elevado, siendo en muchos estudios uno de los factores más comunes asociado a candidemia (4). La duración de la nutrición parenteral aumenta la probabilidad de infección por *Candida*, debido a que aumenta el riesgo de una infección directa por el acceso vascular, aumenta el riesgo de hiperglicemia, así como de una contaminación del líquido infundido.
- Catéter venoso central (CVC): pacientes que llevan un CVC tienen más probabilidad de padecer candidemia debido a que el catéter es una ruta de

acceso directo vascular para *Candida*, además de añadir el posible riesgo de que los fármacos y/o suplementos infundidos al paciente estén contaminados (59).

- Cirugía abdominal: Los pacientes intervenidos de cirugía abdominal compleja, presentan una mayor probabilidad de infección por *Candida*, causado por un daño en la mucosa intestinal lo que conlleva a una translocación mayor por parte de los hongos (35,60).
- Las mucositis asociadas a la quimioterapia (61), las quemaduras extensas (62) y la enfermedad del implante contra el huésped (63) también suponen una pérdida de integridad de la barrera cutáneo mucosa y son factores de riesgo para desarrollar una candidemia

### 3. Inmunosupresión local o sistémica

- Los pacientes inmunodeprimidos debido a neoplasias (55,64), trasplantes de órganos sólido o medula ósea, pacientes infectados por el VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) (65), pacientes malnutridos (66) y pacientes ancianos (21), presentan un riesgo más elevado de padecer candidemia.

#### 1.1.4. Patogenia y manifestaciones clínicas

La vía de entrada de candida en el torrente sanguíneo suele ser a través de la barrera mucosa del tracto digestivo, pero también puede ser vehiculizada por un catéter intravascular, o proceder de un foco de infección localizado.

La capacidad de candida para atravesar la mucosa del tracto digestivo y causar una bacteriemia fue demostrada por Krause *et al.* (67) al observar que la ingesta de una suspensión de candida comportaba una bacteriemia y una bacteriuria. En los pacientes neutropénicos y los pacientes ingresados en UCI (Unidad de cuidados intensivos), se ha demostrado que su flora intestinal presenta un sobre crecimiento de candida, posiblemente condicionado por tratamientos previos con antibióticos de amplio

espectro, el cual en determinadas condiciones del huésped puede invadir el torrente sanguíneo y producir una candidemia.

La entrada de candida en la sangre a través de un catéter endovascular es también una ruta frecuente de candidemia (68), ya que las especies de *Candida* presentan una elevada capacidad de producción de biofilm (69).

La candidemia procedente de una infección localizada es bastante infrecuente, aunque en pacientes con candiduria y obstrucción del tracto urinario se ha observado que es frecuente una candidemia asociada.

Desde el torrente sanguíneo se produce la diseminación de la infección a tejidos profundos, como las vísceras abdominales, el corazón, los ojos, los huesos y articulaciones y el cerebro, dando lugar a microabscesos rodeados de parénquima sano.

Las manifestaciones clínicas que padecen los pacientes con candidemia son muy variables, y frecuentemente inespecíficas o sutiles, pudiendo variar desde cuadros febriles sin foco aparente hasta un síndrome séptico indistinguible de cualquier infección sistemática bacteriana grave. Aunque una manifestación clínica característica de la candidemia son las lesiones cutáneas, que pueden aparecer tanto en pacientes neutropénicos como en aquellos sin neutropenia asociada. Se trata de agrupaciones pustulosas, no dolorosas y con una base eritematosa, que aparecen de forma súbita con una distribución generalizada o focalizada en una o varias regiones del cuerpo.

En el caso de que exista una diseminación hematógena y se afecten uno o múltiples órganos (riñones, corazón, hígado, bazo, pulmones, ojos y sistema nervioso central), se producirán síntomas asociados a dichas localizaciones (70,71).

### **1.1.5. Mortalidad**

La mortalidad de la candidemia sigue siendo actualmente muy elevada, y aunque en determinadas ocasiones este valor puede estar sesgado al incluir la mortalidad

asociada a la enfermedad de base, la mortalidad atribuible a la candidemia, según los estudios publicados, varía entre un 15% y un 50%, (72,73).

Esta variabilidad puede estar motivada por diversos factores, como la especie de *Candida* causante, la población de estudio o la región demográfica, entre otros. Aunque existen factores independientes que se asocian a una mayor mortalidad, como son la edad > 50 años, una elevada comorbilidad (Índice de Charlson > 6) o el origen de la candidemia distinto al catéter (20).

Es conocido que las distintas especies de *Candida* presentan diferentes grados de virulencia (74), lo que podría justificar las diferencias en la mortalidad asociada. *C. tropicalis* suele ser la especie que causa mayor mortalidad (en ocasiones de hasta el 70%), mientras que *C. parapsilosis* es la que presenta una menor mortalidad (73,75).

La mortalidad también varía según lo rápido que se realice el diagnóstico, lo precoz en que se instaure un tratamiento correcto o la premura para eliminar el factor de riesgo desencadenante. Así, una pronta retirada del catéter podría incrementar la supervivencia de los pacientes con candidemia (76,77), tal como se demostró en un estudio prospectivo multicéntrico llevado a cabo en España (CANDIPOP) (31).

#### **1.1.6. Diagnóstico**

Actualmente, el examen microscópico y el hemocultivo siguen siendo las técnicas de referencia para el diagnóstico de la candidemia, sin embargo su sensibilidad es limitada y no pueden considerarse técnicas de diagnóstico precoz (78). Las candidemias presentan cifras elevadas de mortalidad, ya que la infección suele detectarse cuando está muy avanzada. Estas limitaciones han llevado al desarrollo de técnicas alternativas al cultivo, basadas en la cuantificación de antígenos, ácidos nucleicos y otros componentes fúngicos. El diagnóstico convencional de la candidemia se basa en el aislamiento y la identificación de las especies de *Candida* responsables de la infección.

La técnica de referencia para el diagnóstico de la candidemia sigue siendo el hemocultivo aunque presenta varias desventajas. La principal limitación de esta técnica es la escasa sensibilidad global que presenta ( $\approx 50\%$ ) (79,80), aunque ésta puede variar dependiendo de la especie de *Candida* implicada y del sistema de hemocultivo empleado (81). La sensibilidad de los hemocultivos está limitada por el hecho de que tan sólo permite detectar células viables, las cuales son rápidamente eliminadas de la circulación, limitándose más aún si el paciente ha estado bajo tratamiento con antifúngicos. Otra desventaja es el tiempo medio necesario para que un hemocultivo se vuelva positivo, el cual puede llegar a tardar hasta 8 días en función de la especie causante de candidemia (82).

El examen microscópico de la muestra puede en ocasiones detectar la presencia de elementos fúngicos característicos y la presencia de microorganismos no viables que solo pueden ser detectados por microscopía (78). A pesar de que la observación microscópica presenta una baja sensibilidad, siempre que sea posible es recomendable la realización de la misma. El examen directo en micología se basa en el empleo de colorantes o fluorocromos que se unen inespecíficamente a los componentes que constituyen la pared celular, entre ellos la tinción Gram, el blanco de calcoflúor y la tinta china.

Para una correcta identificación del agente causal es indispensable el aislamiento de éste, por lo que el cultivo en medio sólido es esencial. La identificación de levaduras se puede llevar a cabo utilizando criterios morfológicos y/o bioquímicos.

Los criterios morfológicos pueden ser macro o microscópicos, y tienen en cuenta el aspecto de las colonias, la presencia de hifas o pseudohifas, de tubo germinal, de blastoconidias, clamidosporas y artrosporas.

Entre los criterios bioquímicos o enzimáticos se pueden destacar los medios cromógenos (CHROMagar *Candida*<sup>®</sup>, Colorex *Candida*<sup>®</sup> y *Candida* ID2<sup>®</sup>) que permiten identificar fácilmente algunas especies de *Candida*. La principal ventaja de estos medios es que permiten la detección de cultivos mixtos. No obstante, para la identificación de la mayoría de especies de *Candida* se requiere el uso de las técnicas basadas en la asimilación de carbono o nitrógeno (auxonograma), las cuales pueden ser

de lectura manual (Auxacolor<sup>®</sup>), semiautomática (API ID32C<sup>®</sup> y API 20 C AUX<sup>®</sup>) o automática (Vitek 2<sup>®</sup> y Rapid Yeast Identification Panel MicroScan<sup>®</sup>). También existen métodos inmunológicos que permiten la identificación a nivel de especie de *C. albicans* (Bichro-Latex Albicans<sup>®</sup>), *C. krusei* (Krusei Color<sup>®</sup>) o *C. dubliniensis* (Bichro-Dubli<sup>®</sup>), o sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans* (Bacticard Candida<sup>®</sup>, Albicans-Sure<sup>®</sup>, Albistrip<sup>®</sup>, MUAG Test<sup>®</sup>) y *C. glabrata* (GLABRATA RTT<sup>®</sup>).

Las limitaciones que presentan las técnicas convencionales para el diagnóstico de la candidemia han llevado al desarrollo de técnicas alternativas no basadas en el cultivo (80). Entre ellas se encuentran los métodos inmunológicos basados en la detección de antígenos y anticuerpos, especialmente la detección de anticuerpos frente al micelio y a los mananos o la detección del antígeno manano, el cual ha presentado un elevado valor predictivo negativo en pacientes neutropénicos (95%) (83).

Otra técnica alternativa ampliamente utilizada se basa en la detección de componentes fúngicos estructurales o metabólicos como el  $\beta$ -(1,3)-D-glucano que es un componente esencial presente en la pared celular de todos los hongos. Este método se considera un criterio microbiológico de micosis invasora probable, no obstante es una técnica panfúngica, por lo que se deben utilizar técnicas complementarias para identificar la especie causal.

La detección de ácidos nucleicos es una técnica que está siendo ampliamente estudiada ya que permite detectar, a partir de muestras de sangre, concentraciones muy bajas de DNA (Ácido desoxirribonucleico) fúngico, mediante el método de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Las principales ventajas de esta técnica con respecto a los métodos convencionales son una mayor rapidez en el diagnóstico (84) y una mayor sensibilidad y especificidad que el hemocultivo (85,86). No obstante, aun no hay un consenso sobre la fracción de sangre más adecuada para la extracción de DNA, ni sobre que sistema automatizado para la extracción y purificación es más eficaz.

Finalmente, el MALDI-TOF (*Matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight mass spectometry*) es la técnica más novedosa desarrollada para la identificación a nivel de especie del agente causal y la única que se basa en la detección de patrones

proteicos. Esta técnica presenta varias ventajas con respecto a los métodos convencionales utilizados para la identificación. La más importante es el coste de la determinación, que a pesar de que la inversión inicial es elevada, el coste del procesamiento de una muestra es excepcionalmente bajo ( $\approx 0,5\text{€}$ ). Otra ventaja muy importante es el tiempo necesario requerido para la identificación final a nivel de especie, el cual se ve reducido notablemente. No obstante, la principal desventaja de esta técnica es la incapacidad de detectar infecciones mixtas. El MALDI-TOF ya está siendo utilizado por grandes centros hospitalarios y se ha observado que presenta una elevada precisión en la identificación a nivel de especie en *Candida* (87).

### **1.1.7. Tratamiento antifúngico**

Actualmente, existen diversos antifúngicos disponibles para el tratamiento de la candidemia, que se pueden agrupar en 2 clases en función del mecanismo de acción. En primer lugar se encuentran aquellos fármacos que actúan sobre la membrana plasmática interfiriendo la síntesis del ergosterol o alterando su permeabilidad (azoles y polienos) y en segundo lugar los que actúan sobre la pared celular bloqueando la síntesis del glucano (equinocandinas).

Para un correcto manejo de la candidiasis invasiva (CI), diversas sociedades han publicado guías de práctica clínica que engloban aspectos tales como el diagnóstico y el tratamiento de las candidemias. Las guías de práctica clínica más reconocidas a nivel mundial son las publicadas por la sociedad Americana IDSA (*Infectious Disease Society of America*) (88) y la sociedad Europea ESCMID (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease*) (65,81,89–92). Aunque en España también se han editado guías propias (78,93,94) que intentan recoger las particularidades epidemiológicas de nuestra área geográfica, pues como hemos visto con anterioridad, la epidemiología de la candidemia varía en función del continente o el país, por lo que se requiere el desarrollo de guías específicas según la epidemiología local. Además, toda institución debe conocer la distribución de las especies causantes de candidemia en su centro, con la finalidad de poder adaptar las recomendaciones propuestas por dichas guías a los hallazgos de los estudio desarrollados en cada centro.

En el Anexo III se presenta un pequeño resumen de las recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva desarrolladas por el grupo GEMICOMED-SEIMC (94).

## **1.2. *Candida parapsilosis complex***

### **1.2.1. Generalidades**

*Candida parapsilosis* fue aislada por primera vez en el año 1928 por Ashford B. *et al.* (95) de las heces de un paciente que presentaba diarrea, y fue nombrada *Monilia parapsilosis* para distinguirla de la especie más comúnmente aislada, *Monilia psilosis* (actualmente *Candida albicans*). En esa época se describió el organismo como una levadura relativamente no patogénica, que se encontraba en la flora normal de individuos sanos y presentaba muy poca importancia clínica. En el año 1932 fue reclasificada por Langeron (96) como *Candida parapsilosis*, y en el año 1940, *C. parapsilosis* fue identificada como el agente causal de una endocarditis en un usuario de drogas por vía intravenosa (97). En ese momento, los investigadores ya asociaron la infección con la introducción exógena de *C. parapsilosis*, y se prefiguraron la conexión de esta especie con la instrumentación médica invasiva y las soluciones de alimentación parenteral.

*C. parapsilosis* es considerada un organismo ubicuo en el medio natural ya que ha sido aislada del suelo, del agua de mar y de plantas (98). *C. parapsilosis* es en realidad un complejo, formado por tres especies, *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, y de éstas sólo *C. parapsilosis* se ha aislado de las superficies mucosas, de la piel y/o de las uñas (57), por lo que se considera un microorganismo que puede formar parte de la flora comensal de los seres humanos y otros mamíferos.

Actualmente, *C. parapsilosis* es considerada un hongo patógeno emergente, siendo varios los factores que pueden haber contribuido a la creciente incidencia de esta especie (99). Entre ellos, las estancias prolongadas en el hospital y el uso de sistemas de

soporte vital como los catéteres venosos centrales y la nutrición parenteral que por su elevada concentración en glucosa facilita la formación de biofilm y abre una ruta de acceso directo a la sangre. La detección de brotes hospitalarios en las UCI también enfatizan la creciente importancia epidemiológica de *C. parapsilosis* (57,100,101).

*C. parapsilosis* presenta una elevada incidencia en los neonatos con bajo peso y en aquellos que se encuentran en las UCIN (Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales) (48), que son pacientes que requieren en la mayoría de los casos de nutrición parenteral y de un manejo mayor por parte de los trabajadores de la salud.

### 1.2.2. Diferenciación de las especies del complejo

Hasta el año 2005, el complejo *C. parapsilosis* se dividía en 3 grupos (I, II y III) en base a diferencias genéticas ya que son fenotípicamente indistinguibles (Figura 1). Las diferencias observadas mediante el análisis de la amplificación al azar del DNA polimórfico (*randomly amplified polymorphic DNA*; RAPD) (102), el análisis de los espaciadores internos transcritos del DNA ribosomal (*internal transcribed spacer*; ITS) (103), de las secuencias de DNA mitocondrial (104), de las secuencias genéticas del DNA de la topoisomerasa II (105) y de las secuencias de los dominios D1/D2 del RNAr (Ácido ribonucleico ribosomal) (106,107), llevaron a algunos autores a sugerir que los 3 grupos podían considerarse 3 especies distintas. Pero no fue hasta el año 2005 en que Tavanti *et al.* (108) mediante tipificación multilocus de secuencias (*Multilocus sequence typing*; MLST), reveló que las secuencias de los 3 grupos diferían al mismo nivel que lo hacían distintas especies, razón por la que finalmente los 3 grupos fueron designados formalmente como diferentes especies: *C. parapsilosis sensu stricto* (I), *C. orthopsilosis* (II), y *C. metapsilosis* (III). Además, recientemente se ha publicado un estudio en el que se identificaron, mediante el análisis de las regiones ITS y de los *loci mating type*, 2 subgrupos distintos de *C. orthopsilosis* los cuales fueron designados como *C. orthopsilosis* tipo I y *C. orthopsilosis* tipo 2 (109).

Algunos trabajos han revelado que las 3 especies del complejo presentan distintos grados de virulencia (110), diferentes patrones de sensibilidad para determinados antifúngicos (111) y diferencias en su prevalencia (22). No obstante,

actualmente muy pocos laboratorios clínicos distinguen entre estas 3 especies, debido a que no existen métodos comerciales que tenga la capacidad para discriminar entre ellas.



*C. parapsilosis sensu stricto*

*C. orthopsilosis*

*C. metapsilosis*

**Figura 1.** Morfología colonial de las 3 especies del complejo *C. parapsilosis* en CHROMagar Candida.

### 1.2.3. Distribución

*C. parapsilosis* es de las tres, la especie más comúnmente aislada de hemocultivos, con porcentajes que oscilan entre el 75% y el 98% (111,112), mientras que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* son mucho menos frecuentes, entre el 1,4% y el 23,5% (111,113) y el 0,8% y el 5,6%, respectivamente (112,114).

También se han detectado diferencias significativas en función de la región de estudio, tal y como se observó en el estudio ARTEMIS *Antifungal Surveillance* (2001-2006), en el que se encontró una prevalencia de *C. orthopsilosis* en África del 0,7%, mientras que la de Sud América fue del 10,9% (115).

La baja frecuencia detectada tanto en *C. orthopsilosis* como en *C. metapsilosis* podría deberse a la menor virulencia que presentan estas dos especies y al hecho de que *C. metapsilosis* presenta un menor tropismo por la sangre (112).

#### 1.2.4. Factores de virulencia

De entre las especies del género *Candida*, *C. parapsilosis* es la que presenta una menor mortalidad lo que se debe posiblemente a que tiene una menor virulencia (116). Comparativamente con *C. albicans*, *C. parapsilosis* tienen menor capacidad de adherirse a las células epiteliales (117) y es incapaz de formar hifas verdaderas.

Aunque puede presentar otros factores de virulencia, la formación de biofilm es considerado el factor de virulencia más importante en *C. parapsilosis* (99,118–121).

También se han descrito diferencias en el grado de virulencia entre las 3 especies del complejo *C. parapsilosis*, y aunque la mayoría de estudios incluyen pocos aislados de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, parece ser que estas son incapaces de formar biofilm (122) y su implicación como agentes de candidemia es nula o escasa.

#### 1.2.5. Genética

Las especies del complejo *C. parapsilosis* presentan muy poca variabilidad genética comparada con la de las otras especies del género (123–125), con relativa poca frecuencia de heterocigosis y un nivel extremadamente bajo de polimorfismos de un solo nucleótido (125). *C. parapsilosis* es la especie del complejo que exhibe significativamente una menor diversidad genómica comparado con *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. Se cree que las 3 especies podrían haber divergido recientemente, probablemente en el último millón de años, a partir de un ancestro común (126), y el hecho de que determinados alelos identificados en *C. parapsilosis* estén también presentes en *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, mientras que alelos específicos de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* no se identifican en *C. parapsilosis*, hacen suponer que esta última ha emergido recientemente mediante la divergencia de una subpoblación genéticamente homogénea que podría haber sido positivamente seleccionada debido a algún rasgo fenotípico particular (123,126).

### 1.2.6. Sensibilidad

En general, todos los agentes antifúngicos (azoles, polienos, 5-flucitosina y equinocandinas) presentan buena actividad frente a las tres especies del complejo *C. parapsilosis*. No obstante, existen algunas diferencias en la sensibilidad frente a las equinocandinas, la anfotericina B (AMB) y la 5-flucitosina (5FC), siendo *C. parapsilosis* menos sensible *in vitro* a estos antifúngicos que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* (114,115,127,128). Aunque no está claro el porqué de estas diferencias, se ha sugerido que podrían ser resultado de variaciones en los componentes de la pared celular, una menor afinidad del complejo proteico glucano sintetasa, o variaciones en la red de regulación de este complejo (129).

Es bien conocido que las especies de este complejo presentan un menor sensibilidad intrínseca a las equinocandinas, comparada con la de las otras especies del género *Candida*. Así, en la mayoría de estudios publicados, el valor de la CIM<sub>90</sub> (concentración inhibitoria mínima) de caspofungina (CFG), micafungina (MFG) y anidulafungina (AFG) frente a *C. parapsilosis* es de 1, 2 y 2 (µg/ml), respectivamente. Mientras que en *C. albicans* y *C. glabrata* suelen situarse alrededor de 0.12, 0.06 y 0.06 (µg/ml) (130–132), respectivamente. De entre las tres equinocandinas, la CFG es la que presenta mayor actividad *in vitro* frente a *C. parapsilosis*, por el contrario, en las otras especies del género *Candida* se observa una mayor actividad de la AFG y la MFG.

### 1.2.7. Estudios de clonalidad

Las técnicas de tipificación para estudiar la clonalidad de aislados de *Candida* proporcionan información útil en muchos ámbitos (133). En primer lugar, permiten estudiar la dinámica de propagación y la estructura de la población de un hongo en el entorno ambiental y hospitalario. En segundo lugar, son útiles en el estudio de colonización o infección en un único paciente, ya que permite diferenciar entre las cepas aisladas tan solo una vez y las que son capaces de persistir en el paciente durante periodos más prolongados. En tercer lugar, permiten determinar la fuente de infección y la ruta de transmisión de la candidemia, factores importantes para el desarrollo de estrategias de prevención y control de esta infección. En cuarto lugar, proporcionan

información valiosa sobre la evolución y diversificación de las especies, y permiten detectar cepas endémicas. En último lugar, permiten detectar y estudiar brotes hospitalarios.

Cuando se sospeche un brote hospitalario sería deseable estudiar la clonalidad tanto de cepas infectantes como de cepas ambientales recogidas en el entorno de los pacientes y de las manos del personal sanitario (134). Sin un estudio genotípico no es posible cuantificar la proporción de casos causados por genotipos endémicos, por lo tanto la definición de brote hospitalario se basaría solo en un aumento en el número de casos en una unidad hospitalaria en particular.

Como ya se ha comentado, el complejo *C. parapsilosis* presenta muy poca diversidad genética (125) y en consecuencia, pocas son las técnicas que presentan un poder discriminatorio suficiente como para ser capaces de diferenciar entre aislados de *C. parapsilosis* epidemiológicamente no relacionados.

Las técnicas de RAPD (57,108), *shouthern blot* con sondas de hibridación (101) y RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (135) son las que presentan un menor poder discriminatorio. Por el contrario, los microsatélites o STR (*short tandem repeats*) han mostrado un poder discriminatorio muy alto permitiendo identificar múltiples genotipos diferentes (136,137).

La técnica de MALDI-TOF ha sido analizada como método de tipificación para *C. parapsilosis* en un único estudio, demostrando un menor poder discriminatorio que los STR (138).

### **1.3. Las equinocandinas**

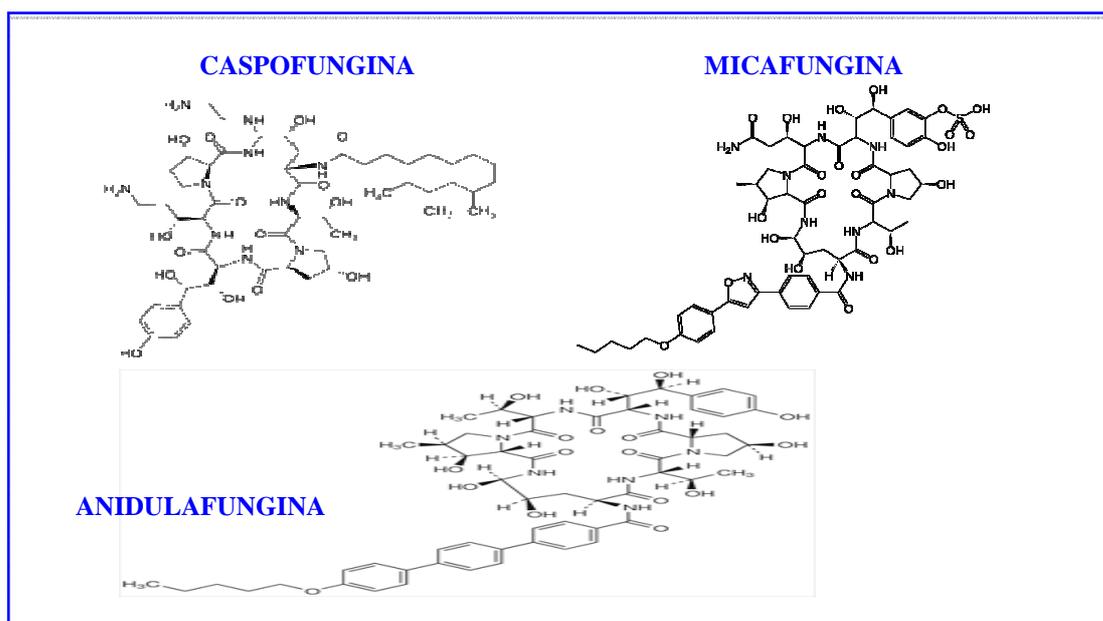
Las equinocandinas son un grupo de antifúngicos semisintéticos de naturaleza lipopeptídica, compuestos por un hexapéptido cíclico unido a una cadena lateral de acilo graso (Figura 2), que son producidos mediante la fermentación de diferentes hongos:

*Coleophoma empedri* (MFG), *Aspergillus nidulans* (AFG) y *Glarea lozoyensis* (CFG) (139).

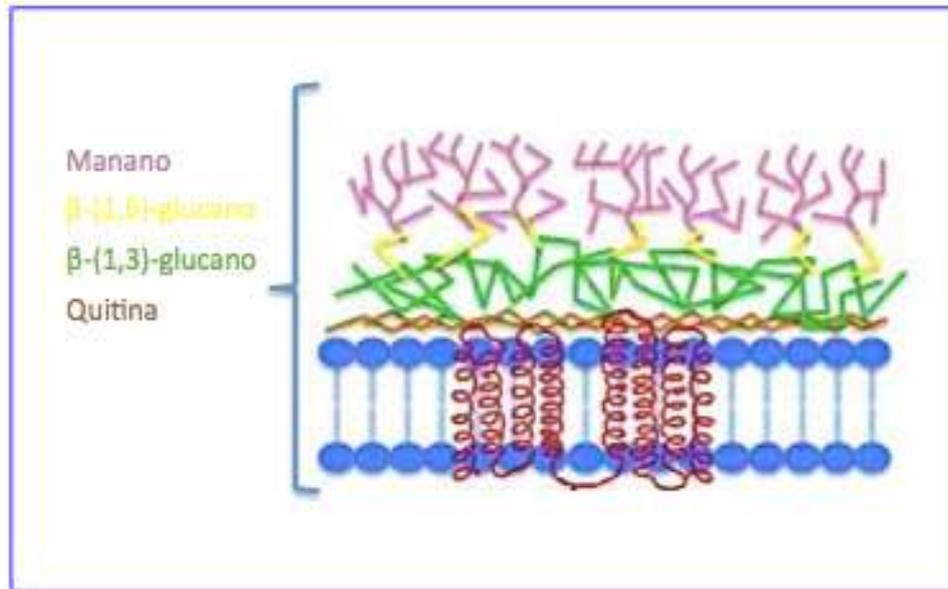
Se trata de la primera clase de antifúngicos, y los únicos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) hasta la actualidad, que inhiben la síntesis del principal componente de la pared celular, el  $\beta$ -(1,3)-D-glucano.

La pared celular de los hongos rodea la membrana celular que está compuesta principalmente de ergosterol y proteínas transmembrana, y es indispensable para mantener la viabilidad del hongo ya que es la responsable de la integridad estructural y de la forma de la célula. La pared celular está formada por una capa interna, compuesta por dos polisacáridos unidos covalentemente, el  $\beta$ -(1,3)-D-glucano ( $\approx$ 55%) y la quitina ( $\approx$ 3%), que están ausentes en el cuerpo humano, y por el  $\beta$ -(1,6)-D-glucano ( $\approx$ 5%), que une la capa interna con la capa externa, compuesta por polisacáridos de manosa ( $\approx$ 20%) y proteínas de la pared celular (Figura 3) (140).

El hecho de que la acción de estos antifúngicos vaya dirigida a inhibir la síntesis de un compuesto propio del hongo e indispensable para su viabilidad, hace que se trate de un grupo de antifúngicos sumamente específicos y potencialmente fungicidas (141).



**Figura 2.** Estructura química de las equinocandinas.



**Figura 3.** Estructura de la pared celular de candida.

### 1.3.1. Mecanismo de acción y complejo β-(1,3)-D-glucano sintetasa

Las equinocandinas operan de forma no competitiva inhibiendo el complejo enzimático β-(1,3)-D-glucano sintetasa (GS) (Figura 4) encargado de la biosíntesis del β-(1,3)-D-glucano (142–146). La inhibición de la GS, conlleva una depleción del β-(1,3)-D-glucano de la pared celular, una inestabilidad osmótica y finalmente la lisis y la muerte celular. (147–149).

Aunque se desconoce el modo en que interaccionan las equinocandinas y la GS, se cree que la cadena de acilo graso del antifúngico se une a la membrana celular e interacciona con las regiones de la GS que quedan expuestas en la parte exterior de la membrana (150,151).

La β-(1,3)-D-GS cataliza la reacción de transferencia de fracciones de azúcar de moléculas donadoras a moléculasceptoras específicas mediante la formación de enlaces glucosídicos (152), según la siguiente reacción:



El complejo GS está formado por dos subunidades, la Fksp y la Rhop. La subunidad Fks es la fracción catalítica del complejo, se trata de una proteína con unos 16 dominios transmembrana codificada por los genes *FKS*. La subunidad Rho, está codificada por el gen *RHO* y es la fracción que regula la actividad de la GS (153–155).

En las levaduras existen 3 genes parálogos que codifican para la fracción catalítica del complejo GS, el *FKS1*, *FKS2* y *FKS3*. En la mayoría de las especies, el gen *FKS1* es el más activo, mientras que el *FKS2* es expresado durante el ciclo sexual y durante la esporulación en condiciones de inanición (156), y el gen *FKS3* está involucrado en el ensamblaje de la pared de la espora (157).

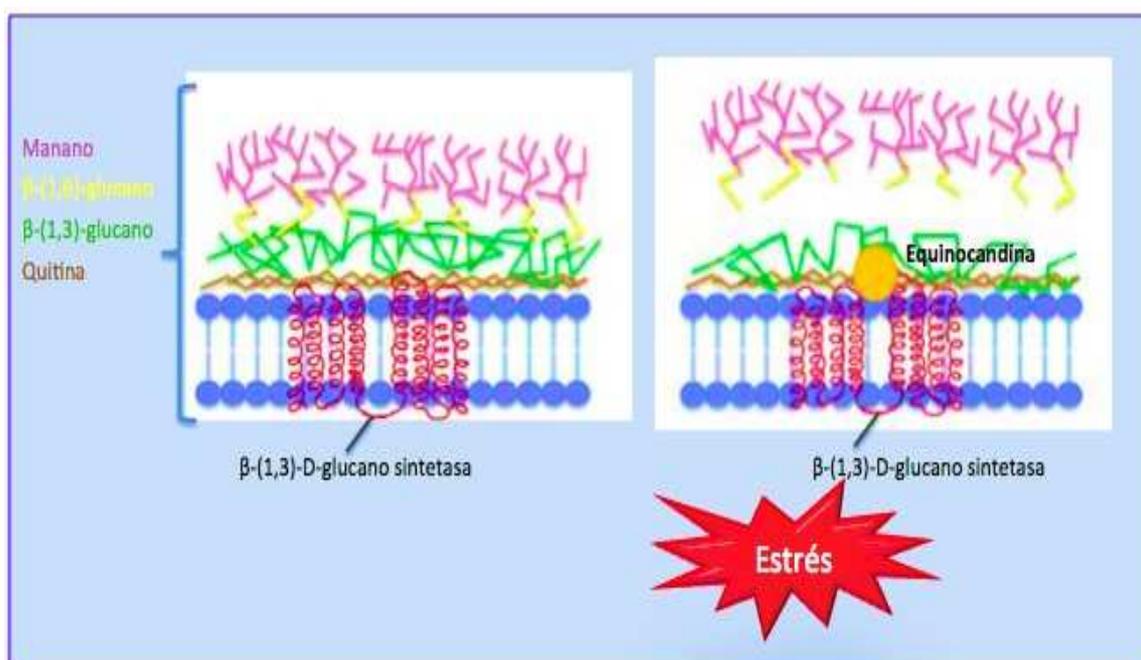


Figura 4. Mecanismo de acción de las equinocandinas.

### 1.3.2. Mecanismos de resistencia descritos en *Candida*

Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el que *C. parapsilosis* puede resistir la acción de la equinocandinas, se han analizado diversos mecanismos de resistencia en distintas especies de *Candida* que podrían estar involucrados en la sensibilidad reducida a las equinocandinas (*Reduced echinocandin susceptibility*; RES).

### 1.3.2.1. Modificación de la diana de acción

El principal mecanismo de resistencia frente a las equinocandinas descrito en las especies del género *Candida* es la modificación de la diana de acción (Figura 5). Se han descrito mutaciones nucleotídicas en regiones específicas de los genes *FKS*, que comportan sustituciones aminoacídicas en la enzima  $\beta$ -(1,3)-D-GS, las cuales reducen la capacidad de las equinocandinas para inhibir la acción de la enzima, confiriendo al hongo una sensibilidad reducida a las equinocandinas que se ha asociado al fracaso clínico (158,159). No obstante, estas mutaciones también podrían comprometer la virulencia y el *fitness* de estos aislados (160).

El primer estudio en el que se identificaron mutaciones en el gen *FKS1* de cepas clínicas de *C. albicans*, aisladas de pacientes que no respondieron al tratamiento con caspofungina, y que estaban situadas específicamente en dos regiones conservadas, la región HS (*hot spot*) 1 que incluye 9 aminoácidos y la región HS2 que incluye 8 aminoácidos, fue llevado a cabo por Park *et al.* en el año 2005 (159). Estudios posteriores demostraron que aislados clínicos de *C. tropicalis* y *C. krusei* con sensibilidad reducida a la caspofungina, también presentaban mutaciones puntuales en el gen *FKS1* y también se agrupan en dos regiones altamente conservadas, los HS (161). En el caso de cepas de *C. glabrata* no sensibles a las equinocandinas, se han detectado mutaciones en las regiones HS de los genes *FKS1* y *FKS2* (162). En el anexo IV se detallan las mutaciones descritas hasta la actualidad en los genes *FKS*, en las distintas especies de *Candida*.

En el caso de *C. parapsilosis*, se ha detectado un polimorfismo natural (sustitución de una prolina por una alanina en la posición 660; P660A) en la región HS1 del gen *FKS1*, que se considera el responsable de la menor sensibilidad intrínseca de estas especies a las equinocandinas (163). Como fue demostrado en estudios posteriores, que evidenciaron que las cepas de *C. albicans* y *C. glabrata* que habían adquirido una mutación en la posición equivalente a la del polimorfismo P660A, presentaban una disminución de la sensibilidad de la GS a las equinocandinas de 2 log con respecto a las cepas *wild type* (WT) (163). Así mismo, en este estudio, mediante ingeniería genética, introdujeron la mutación P647A, equivalente a la P660A, en una

cepa sensible de *Saccharomyces cerevisiae* y observaron que la GS de ésta también reducía su sensibilidad a las equinocandinas en 2 log.

A pesar de que parece ser que se ha identificado el mecanismo por el cual las especies del complejo *C. parapsilosis* presentan una menor sensibilidad intrínseca a las equinocandinas, hasta la fecha, aún no se ha podido establecer el mecanismo de resistencia por el que determinados aislados de *C. parapsilosis* adquieren una sensibilidad reducida a las equinocandinas. No existe ningún aislado clínico de *C. parapsilosis* con una sensibilidad reducida adquirida a alguna de las 3 equinocandinas, al que se le haya identificado una mutación en las regiones HS1/HS2 del gen *FKS1*, y el gen *FKS2* nunca ha sido estudiado en *C. parapsilosis*. No obstante, actualmente son pocos los aislados de *C. parapsilosis* resistentes a las equinocandinas o con una CIM >2 µg/ml descritos y a los que se les ha analizado el gen *FKS1* (130).

Tal y como pasa con *C. parapsilosis*, especie en la que aún no se ha descrito el mecanismo de resistencia que permite que determinadas cepas adquieran resistencia frente a estos antifúngicos, en el caso de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*, la modificación de la diana de acción como mecanismo de resistencia no permite explicar la sensibilidad reducida frente a las equinocandinas en todos los aislados resistentes descritos (130,161,162,164–167). Por lo que algunos autores han sugerido la existencia de otros mecanismos de resistencia a las equinocandinas.

#### **1.3.2.2. Bombas de expulsión**

Uno de los mecanismos alternativo a la modificación de la diana propuesto como mecanismo de resistencia a las equinocandinas es la sobreexpresión de las bombas de expulsión (Figura 5). Este mecanismo fue descrito por Schuetzer-Muehlbauer *et al.* (2003) (168) en un estudio en el que analizó tres aislados de *C. albicans* resistentes al fluconazol (FLC), ketoconazol e itraconazol (ITC). Los 3 aislados presentaron elevados niveles de RNAm para los genes *CDR1* y *CDR2* que codifican para bombas de expulsión y están implicados en la resistencia a los azoles en *Candida*, y observaron que 2 de ellos, concretamente los que presentaron mayor sobreexpresión de las bombas de expulsión, eran además resistentes a la CFG. Se

secuenció el gen *FKS1* de los 3 aislados de *C. albicans* y no se detectó ninguna mutación.

Contrario a esta hipótesis son los resultados descritos por Niimi *et al.* (2006) (169) que condujo un estudio en el que concluyó que la sobreexpresión de los ABC transporters (ATP-binding cassette), *CDR1* y *CDR2* de *C. albicans* producen tan solo una ligera disminución de la sensibilidad frente a la CFG. Además, ninguno de los aislados de *Saccharomyces cerevisiae* en los que, mediante ingeniería genética, se sobreexpresó Cdr1p y/o Cdr2p de *C. albicans*, presentó una reducción significativa de la sensibilidad a la CFG o a la MFG.

### **1.3.2.3. Respuestas adaptativas al estrés causado por las equinocandinas**

Un último mecanismo de resistencia o tolerancia descrito frente a las equinocandinas, que actualmente está siendo estudiado, es la activación de respuestas adaptativas o de compensación frente a estímulos externos estresantes para la célula (Figura 5). En un intento de mantener la integridad celular en presencia de equinocandinas, la célula activa una respuesta de compensación en la que se incrementa la concentración de quitina de la pared celular para contrarrestar la depleción de glucano (170).

El incremento de la síntesis de quitina en la pared celular está mediado a través de múltiples vías de integridad de la pared celular. Entre ellas la vía PKC (*Protein Kinase C*), HOG (*High-Osmolarity Glycerol*) y las vías de señalización de la calcineurina/ $\text{Ca}^{2+}$ . Estas vías de señalización promueven la síntesis de factores de transcripción que a su vez controlan la expresión de genes relacionados con la síntesis de la pared celular. Entre ellos, los genes *CHS* (*Chitin Synthase*) que codifican para las enzimas Chsp que son las encargadas de la síntesis de la quitina (141).

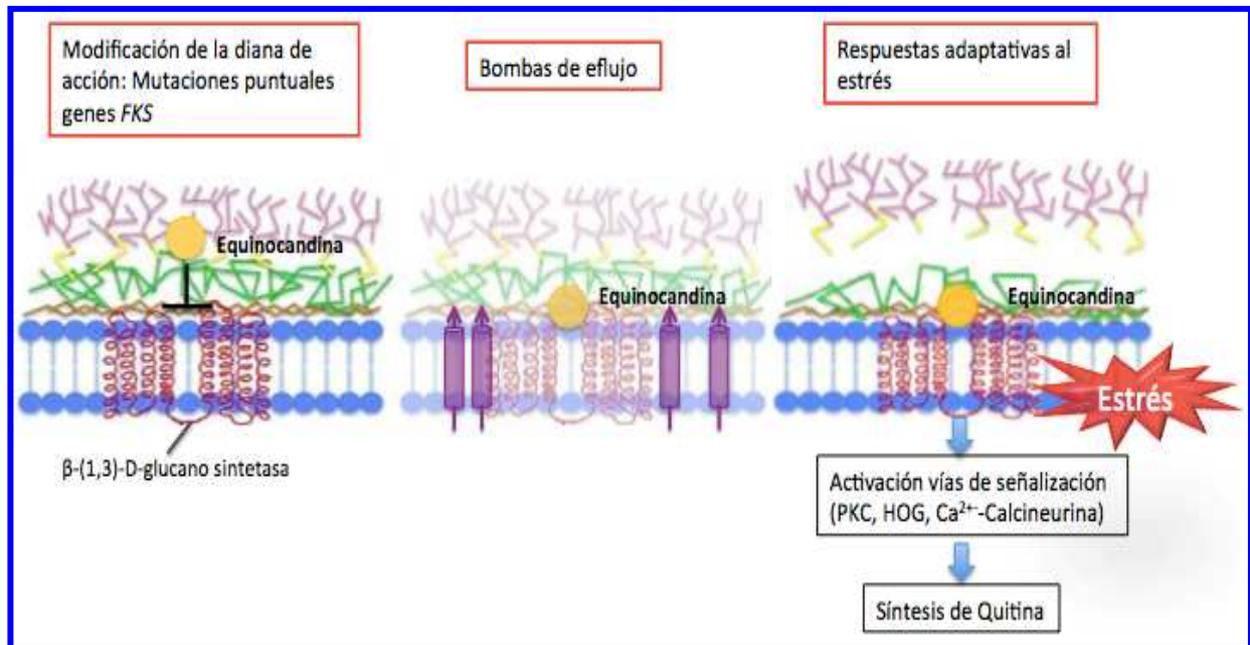
Se ha visto que el tratamiento de células WT de *C. albicans* con  $\text{Ca}^{2+}$  y calcofluor blanco (CFW), componentes que activan las vías calcineurina/ $\text{Ca}^{2+}$  y PKC respectivamente, conllevan a un incremento tres veces mayor del contenido de quitina, lo que reduce la sensibilidad a la CFG (171,172). Los aislados de *C. albicans* que

presentan niveles basales de quitina más elevados, también presentan una menor sensibilidad a la CFG (173).

En un estudio llevado a cabo por Walker *et al.* (2008) (172), se demostró que el tratamiento previo con equinocandinas en aislados de *C. albicans* estimulaba la expresión de los genes *CHS*, incrementaba la actividad enzimática de Chsp, consecuentemente aumentaba el contenido basal de quitina presente en la pared celular y disminuía la sensibilidad de los aislados a las equinocandinas *in vitro*. Lee *et al.* (2012) (174) observó que no sólo ocurría *in vitro*, si no que las equinocandinas también eran menos eficaces *in vivo* frente a aislados de *C. albicans* con elevados niveles de quitina en la pared celular. Observó que ratones infectados por cepas que contenían elevados niveles de quitina presentaban cargas fúngicas mayores y más pérdida de peso durante la infección, que los ratones infectados por cepas con concentraciones más bajas de quitina en la pared celular. Además, detectaron que algunos clones recuperados después de la infección presentaban niveles de quitina 1.6 veces mayores que las cepas WT, mantenían una significativa menor sensibilidad a la CFG *in vitro* y habían adquirido una mutación puntual en el gen *FKSI* resultando en la sustitución aminoacídica S645Y. Con estos resultados sugirieron que la eficacia de la CFG frente a *C. albicans* fue reducida *in vivo* debido a un incremento en los niveles basales de quitina de la pared celular y/o a mutaciones puntuales en el gen *FKSI*.

Walker *et al.* (2013) (175) publicó otro artículo en el que pretendía determinar si aislados clínicos de diferentes especies de *Candida*, con diferentes CIM frente a la CFG, eran menos sensibles a este antifúngico debido a un mayor contenido basal de quitina en la pared celular, a la adquisición de mutaciones puntuales en el gen *FKSI* o a una combinación de ambos mecanismos. Todos los aislados estudiados eran sensibles a la CFG, con tan solo un aislado de *C. krusei* resistente. Los resultados obtenidos en este estudio, demostraron que en la mayoría de los aislados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, en un aislado de *C. krusei* y en otro de *C. parapsilosis* después de un tratamiento previo con CFG, se activaba la síntesis de quitina y presentaban una sensibilidad reducida a la CFG. Además, ninguno de los aislados, a excepción de un aislado de *C. parapsilosis*, mostró una mutación en la región HS1 del gen *FKSI*. El aislado de *C. parapsilosis* sensible a la CFG que presentó la mutación S656P es el

único, en toda la bibliografía publicada hasta la fecha, al que se le ha identificado una mutación en la región HS1 del gen *FKS1*.



**Figura 5.** Mecanismos de resistencia descritos en *Candida* frente a las equinocandinas.

## **2. OBJETIVOS**

---



Los objetivos de esta tesis doctoral han sido:

1. Evaluar la incidencia y la distribución de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* a lo largo de 15 años en un Hospital Universitario.
2. Determinar de la sensibilidad *in vitro* de *C. parapsilosis* a los azoles, la anfotericina B, la 5-fluorocitosina y las equinocandinas a lo largo de 15 años en un Hospital Universitario.
3. Comparar los patrones de sensibilidad a las equinocandinas entre aislados de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.
4. Determinar la implicación de la modificación de la diana de acción de las equinocandinas como mecanismo de resistencia tanto intrínseco como adquirido a estos antifúngicos, mediante la correlación de las CIM frente a la caspofungina, la anidulafungina y la micafungina con la presencia de mutaciones en los genes *FKS1* y *FKS2* en una colección de aislados clínicos de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, y otras especies relevantes del género *Candida*.
5. Estudiar los niveles de quitina presentes en la pared celular, tanto basales como después de un tratamiento con caspofungina, para determinar la posible implicación como mecanismo alternativo a la modificación de la diana de acción, en la reducida sensibilidad intrínseca y adquirida a las equinocandinas en *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.
6. Genotipar aislados de *C. parapsilosis* para determinar la presencia de cepas clonales así como de clones endémicos.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

---



### **3.1. Epidemiología de las fungemias en un Hospital Universitario a lo largo de 15 años: relevancia de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis***

#### **3.1.1. Estudio epidemiológico de las fungemias**

##### **3.1.1.1. Periodo del estudio y definiciones**

En el estudio fueron incluidos todos los episodios de fungemia detectados en los pacientes hospitalizados entre Enero de 1997 y Diciembre de 2011 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. A lo largo de todo el periodo de estudio, este hospital tuvo un área de influencia con una población de aproximadamente 420.000 habitantes representando el 25% de la población de Barcelona.

Un episodio de fungemia fue definido como el aislamiento de una levadura o un hongo filamentoso en un hemocultivo. En los pacientes con varios aislamientos, se consideró que se trataba de un único episodio cuando los cultivos de sangre fueron positivos por la misma especie y estuvieron separados por menos de 30 días. Se consideró que se trataba de dos episodios distintos de fungemia cuando en un segundo aislamiento se aislaron levaduras de especies distintas o cuando tratándose de la misma especie había transcurrido más de un mes desde el episodio previo.

##### **3.1.1.2. Hemocultivos e identificación de las levaduras aisladas**

Para el diagnóstico de las septicemias se empleó el sistema semiautomático de hemocultivos BacT/Alert®. En los hemocultivos positivos se extrajo una alícuota y se practicaron una o varias extensiones que fueron observadas microscópicamente después de una tinción de Gram. En caso de observarse la presencia de levaduras, se sembraron 1 o 2 gotas de la alícuota en agar glucosado de Sabouraud suplementado con gentamicina y cloranfenicol (Oxoid, Madrid, España), agar sangre (Oxoid, Madrid, España), y CHROMagar Candida (CHROMagar, Paris, Francia). Las placas de los cultivos fueron incubadas a 37°C durante y las colonias crecidas fueron examinadas macroscópicamente y microscópicamente. Las levaduras fueron identificadas mediante el uso de kits comerciales (VITEK 2 YST, API ID 32C, o API 20C AUX) siguiendo las

instrucciones del fabricante.

El primer aislado de cada uno de los casos de fungemia fue resembrado en agar sangre (Oxoid, Madrid, España) y conservado por liofilización.

Un aislado de *C. parapsilosis* de cada uno de los episodios de fungemia fue recuperado de la colección de liófilos guardada en el laboratorio de micología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, para ello los liófilos fueron rehidratados con suero fisiológico y sembrados en CHROMagar Candida (CHROMagar, Paris, Francia) y en agar Sabouraud (Oxoid, Madrid, España), para testar su viabilidad y pureza.

### **3.1.2. Identificación molecular de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis***

Para distinguir entre las 3 especies que componen el complejo *C. parapsilosis*: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, se amplificó y secuenció el gen 5.8s rRNA y las secuencias nucleotídicas adyacentes al gen que comprenden las regiones ITS1 (Internal Transcribed Spacer) e ITS2 (108).

#### **3.1.2.1. Extracción del DNA genómico**

El DNA genómico fue extraído utilizando el kit comercial InstaGene Matrix (BioRad, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Resumidamente, a partir de un cultivo en agar Sabouraud (Oxoid, Madrid, España) de 24-48h, se resuspendieron 2 o 3 colonias de la levadura en 200 µl de agua destilada estéril (dH<sub>2</sub>O). Se centrifugó a 12.000 rpm durante 5' y se descartó el sobrenadante. Se añadió 200µl de la matriz de InstaGene Matrix al sedimento. Se incubó la mezcla a 56°C durante 30'. Seguidamente se agitó durante 30'' y se hirvió durante 8'. Se volvió a agitar durante 30'' y se centrifugó a 10.000 rpm durante 3'. Se pasó el sobrenadante, fase que contenía el DNA genómico, a un nuevo tubo tipo eppendorf estéril.

### 3.1.2.2. Amplificación y secuenciación de la región ITS

La amplificación de la región ITS se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; *Polimerase Chain Reaction*) con los iniciadores ITS-1 e ITS-4 (Tabla 2). La mezcla de reacción de PCR contenía 5 µl de tampón 10x con magnesio a una concentración de 15 mM (Roche), 4 µl de dNTPs (*Deoxynucleotide Triphosphates*) a una concentración de 10mM, 5 µl de cada uno de los iniciadores a una concentración de 10 µM, 0,5 µl de Taq Expand a una concentración de 3,5 U/µl (Roche) y 4 µl de la extracción de DNA genómico (108,176), en 26,5 µl de dH<sub>2</sub>O estéril. Las condiciones de amplificación fueron: un primer ciclo de desnaturalización inicial de 6' a 95°C, seguido de 35 ciclos de 45'' a 95°C para la desnaturalización, 60'' a 55°C para el *annealing* y 90'' a 72°C para la extensión. Se incluyó un paso adicional de 10' a 72°C. La secuenciación de todos los productos de PCR se llevó a cabo en la empresa Macrogen (Amsterdam, Holanda).

Las secuencias de DNA obtenidas fueron comparadas con las secuencias de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, y *C. metapsilosis* que aparecen en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (GenBank) (Número de acceso GenBank: AB109275, EU557373, EU557369, respectivamente).

## 3.2. Estudio de sensibilidad en *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* y otras especies relevantes de *Candida*.

### 3.2.1. Estudio de sensibilidad *in vitro* frente a 9 agentes antifúngicos en *C. parapsilosis complex* causantes de fungemia (1997-2011)

El estudio de sensibilidad *in vitro* se llevó a cabo en los 68 aislados de *C. parapsilosis complex* identificados en el estudio epidemiológico de las fungemias llevado a cabo entre los años 1997 y 2011 (67 aislados de *C. parapsilosis* y 1 aislado de *C. orthopsilosis*). Para ello, se empleó el panel colorimétrico Sensititre YeastOne SYO-10 (Trek Diagnostic Systems, Reino Unido), que permite el estudio de sensibilidad frente a 9 antifúngicos: anidulafungina (AFG), micafungina (MFG), caspofungina

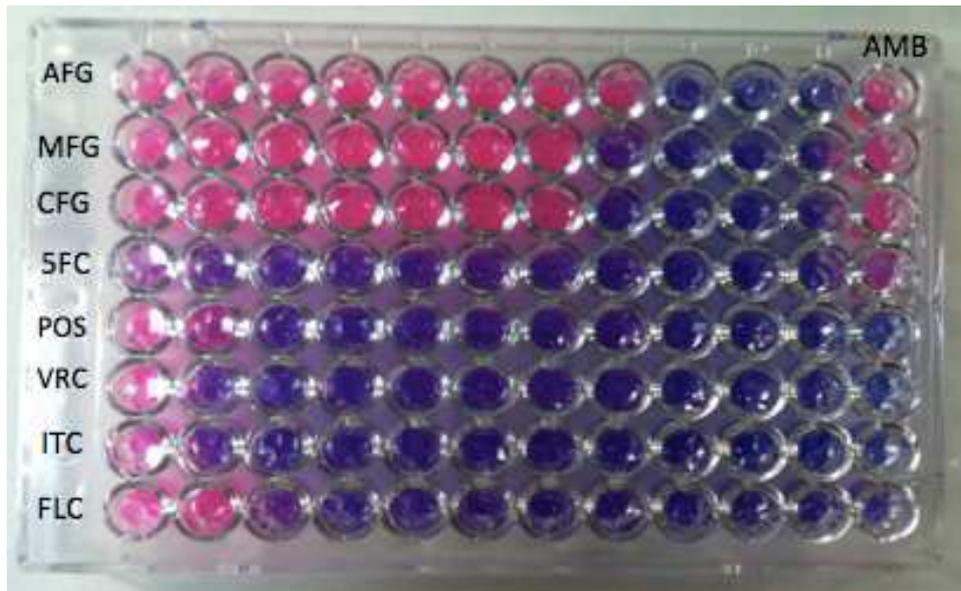
(CFG), flucitosina (5FC), posaconazol (POS), voriconazol (VRC), itraconazol (ITC), fluconazol (FLC), y anfotericina B (AMB).

El estudio de sensibilidad se realizó a partir de un cultivo puro de 24h siguiendo las recomendaciones del fabricante: partiendo de una suspensión 0,5 McFarland se transfieren 20 µl de ésta a 11 ml del caldo de inóculo YestOne y mediante el uso de un inoculador automático (AutoInoculator nefelómetro Sensititre®) se transfirieron 100 µl a cada uno de los pocillos del panel, se cubre la placa con una lámina adhesiva y se incuba durante 24h a 35°C.

Los resultados se leyeron visualmente con la ayuda de un espejo de lectura valorando el crecimiento de la levadura en función del cambio de color del indicador de crecimiento colorimétrico, de azul (negativo, no crecimiento) a rosa (positivo, si crecimiento) (Figura 6).

En el caso de los azoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol) y la flucitosina, la CIM (concentración inhibitoria mínima) se definió como la concentración más baja del agente antifúngico que inhibe sustancialmente el desarrollo de la levadura, es decir el primer pocillo que muestra un cambio de color menos intenso que el del pocillo de control de crecimiento positivo (equivalente al 50% de inhibición del crecimiento), mientras que en el caso de las equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina) y la anfotericina B, la CIM se definió como el primer pocillo que no presentaba cambio de color (la menor concentración que presenta color azul).

Para la interpretación de los resultados, se utilizaron los nuevos puntos de corte clínicos (CBP; *Clinical BreakPoints*) específicos para especie y los puntos de corte epidemiológicos (ECVs; *Epidemiological CutOff values*) propuestos por Pfaller *et al.* (177–183). Se calcularon los valores de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> para todos los antifúngicos.



**Figura 6.** Panel colorimétrico Sensititre YeastOne SYO-10. Los pocillos rosas indican crecimiento, mientras que los azules indican ausencia de crecimiento.

### **3.2.2. Cepas de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* y otras especies relevantes de *Candida* empleadas en el análisis de sensibilidad *in vitro* y en el estudio de mecanismos de resistencia a las equinocandinas**

El estudio de la sensibilidad *in vitro* (empleando el panel colorimétrico Sensititre YeastOne SYO-10, tal y como se ha explicado en el apartado anterior) y el análisis de los mecanismos de resistencia a las equinocandinas se llevó a cabo en los 68 aislados de *C. parapsilosis complex* mencionados con anterioridad. También se incluyeron las cepas de *C. parapsilosis* causantes de fungemia en el Hospital de Sant Pau durante el año 2012 (5 aislados) y 5 aislados de *C. parapsilosis* cedidos amablemente por la Dra. Emilia Cantón de la Unidad de Microbiología Experimental del Hospital Universitario La Fe (Valencia, España).

Además, se incluyeron en el estudio otros 28 aislados clínicos de especies de *Candida* diferentes a *C. parapsilosis* y no sensibles a alguna de las 3 equinocandinas, obtenidos de hemocultivos: *C. albicans* (5 aislados), *C. glabrata* (12 aislados), *C. krusei* (7 aislados) y *C. tropicalis* (4 aislados). Dieciocho de estos aislados fueron cedidos por la Dra. Emilia Cantón procedentes de la colección de cepas del estudio FUNGEMYCA (184).

Adicionalmente se incluyeron 6 cepas clínicas de *C. krusei* sensibles a las 3 equinocandinas procedentes de la colección de liófilos del Servicio de Microbiología del Hospital de Sant Pau, más 3 aislados de *C. orthopsilosis* y 3 de *C. metapsilosis*, cedidos amablemente por la Dra. Carol Munro y el Dr. Neil Gow (Aberdeen, Reino Unido).

### **3.2.3. Cepas control incluidas en el estudio de sensibilidad y de mecanismos de resistencia**

En el estudio de sensibilidad se incluyó la cepa ATCC22019 de *C. parapsilosis* y la cepa ATCC6258 de *C. krusei*. En el análisis de los niveles de quitina presentes en la pared celular, evaluado como posible mecanismo de resistencia, se incluyó como control la cepa wild type de *C. albicans* SC5314, cedida por la Dra. Carol Munro y el Dr. Neil Gow (Aberdeen, Reino Unido).

### **3.3. Resistencia a las equinocandinas en *C. parapsilosis complex* por modificación de la diana de acción: análisis de las regiones HS1 y HS2 de los genes *FKS1* y *FKS2***

Para la amplificación de las regiones HS1 y HS2 de los genes *FKS1* y *FKS2* en las distintas especies del género *Candida* se utilizaron diferentes iniciadores en función de la especie (Tabla 2).

- Para la amplificación de las regiones HS1 y HS2 del gen *FKS1* en *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. albicans* y *C. tropicalis* se utilizaron los iniciadores universales descritos previamente (163).
- Para la amplificación de las regiones HS1 y HS2 del gen *FKS2* de *C. parapsilosis* se diseñaron en este estudio iniciadores específicos.

- Para la amplificación de las regiones HS1 y HS2 del gen *FKS1* de *C. krusei* y *C. glabrata* y de las regiones HS1 y HS2 del gen *FKS2* de *C. glabrata* se utilizaron los iniciadores descritos con anterioridad por otros autores (161,185).

Para la amplificación de estas regiones se aplicaron dos protocolos distintos y diferentes temperaturas de hibridación para cada par de iniciadores, como se detalla en la Tabla 2.

- En el caso de las especies del complejo *C. parapsilosis*, *C. albicans* y *C. tropicalis*, las PCRs se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl que contenía 2 µl de tampón 10x con magnesio a una concentración de 15 mM (Roche), 2 µl de dNTPs a una concentración de 10 mM, 2,5 µl de cada uno de los dos iniciadores a una concentración de 5 µM, 0,4 µl de Taq Expand a una concentración de 3,5 U/µl (Roche), 2 µl de la extracción de DNA genómico y 13,6 µl de dH<sub>2</sub>O estéril. Las condiciones de amplificación fueron: un primer ciclo de desnaturalización inicial de 10' a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30'' a 95°C para la desnaturalización, 30'' a la temperatura determinada de cada par de iniciadores para la hibridación (Tabla 2) y 60'' a 72°C para la extensión. Se incluyó un paso adicional de 10' a 72°C (BioRadi-cycler).
- En el caso de *C. glabrata* y *C. krusei*, la mezcla de reacción utilizada tenía un volumen total de 50 µl: 5 µl de tampón 10x (Roche), 8,4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5 µl de dNTPs (10mM), 2,5 µl de cada uno de los iniciadores (10 µM), 0,6 µl de Taq Expand (3,5U/µl) (Roche), 4 µl de la extracción de DNA genómico y 22 µl de dH<sub>2</sub>O estéril. Las condiciones de amplificación fueron: un primer ciclo de desnaturalización inicial de 10' a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30'' a 94°C para la desnaturalización, 30'' a la temperatura de hibridación determinada para cada par de iniciadores y 30'' a 72°C para la extensión. Se incluyó un paso adicional de 10' a 72°C (BioRadi-cycler).

La secuenciación de todos los productos de PCR se llevó a cabo en la empresa Macrogen (Ámsterdam, Holanda). Para el análisis de las secuencias se empleó el software BioNumerics Software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) y las secuencias nucleotídicas obtenidas, así como las correspondientes secuencias

aminoacídicas fueron comparadas con las secuencias depositadas en el GenBank. Los números de acceso para cada uno de los genes (número de acceso de la secuencia proteica) y especies son los siguientes: *C. parapsilosis* FKS1: EU221325 (ABX80511); *C. parapsilosis* FKS2: EU221326 (ABX80512); *C. orthopsilosis* FKS1: EU350513 (ABY67253); *C. metapsilosis* FKS1: EU350514 (ABY67254); *C. albicans* FKS1: D88815 (BAA21535); *C. tropicalis* FKS1: XM\_002550317 (XP\_002550363); *C. krusei* FKS1: EF426563 (AAY40291); *C. glabrata* FKS1: XM\_446406 (XP\_446406); y *C. glabrata* FKS2: XM\_446401 (XP\_446401).

Para llevar a cabo el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones en las que se detectaron mutaciones en la Fks1p en aislados de *C. parapsilosis* y compararlas con la Fks1p de 7 especies del género *Candida* y con la de *Saccharomyces cerevisiae*, se empleó el programa ClustalW. Los números de acceso de la Fks1p de las especies empleadas para la comparación han sido: *C. parapsilosis*, ABX80511; *C. orthopsilosis*, ABY67253; *C. metapsilosis*, ABY67254; *C. albicans*, BAA21535; *C. glabrata*, XP\_446406; *C. tropicalis*, XP\_002550363; *C. krusei*, AAY40291; *S. cerevisiae*, AAC13763.

### **3.4. Resistencia a las equinocandinas en *C. parapsilosis* complex por respuestas adaptativas al estrés: implicación de los niveles basales de quitina en la reducida sensibilidad a las equinocandinas y su modificación por la acción de la caspofungina**

#### **3.4.1. Determinación de los niveles basales de quitina en las especies del complejo *C. parapsilosis***

Mediante una hidrólisis ácida de la pared celular de la levadura, se analizaron los niveles basales de los monómeros que constituyen la quitina (glucosamina), los glucanos (glucosa) y los mananos (manosa) presentes en la pared celular y se cuantificaron mediante HPLC.

A continuación se detallan los pasos seguidos para el desarrollo de este estudio.

#### **3.4.1.1. Preparación del cultivo**

A partir de un cultivo puro de 24 horas en agar glucosado de Sabouraud, se inoculó un caldo YPD (*Yeast Extract-Peptone-Dextrose*) y se incubó toda la noche a 30°C con agitación a 200 rpm. A partir de este cultivo, se inoculó un nuevo caldo de YPD fresco, ajustando la concentración de la levadura a una densidad óptica (DO) final de 0,2 a 600nm de longitud de onda. Este nuevo cultivo se incubó en agitación a 200 rpm durante 5 h a 30°C y se comprobó que estaba en fase exponencial de crecimiento calculando la DO, la cual debería estar situada entre valores de 0,6 y 0,8.

#### **3.4.1.2. Extracción de la pared celular, hidrólisis ácida y cuantificación de carbohidratos mediante HPLC**

Los cultivos se centrifugaron durante 5' a 5000 rpm y el sedimento, fase que contenía las células, se lavó y resuspendió en 1 ml de dH<sub>2</sub>O. Seguidamente, las células fueron fracturadas físicamente con el uso de perlas de vidrio (0,5 mm) en una máquina FastPrep (Qbiogene). Las condiciones utilizadas para la rotura física de las células fueron 20 veces X 45'' a una velocidad de 4 m/s. Se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo de 50 ml, las perlas de vidrio fueron lavadas entre 3 y 4 veces mediante la adición de 1 ml de NaCl a 1M y los lavados fueron añadiéndose sucesivamente al tubo de 50 ml. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5'. El sedimento se lavó 5 veces con NaCl a 1M. Finalmente, se resuspendió el sedimento con 2 ml de dH<sub>2</sub>O. Se tomaron 2 alícuotas de 1 ml cada una y se transfirieron a un tubo de tapón de rosca que había sido pesado previamente. Se centrifugaron los tubos a 11000 rpm durante 5' a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió en tampón de extracción SDS (50 mM TrisHCl, pH 7,8, 2% SDS, 100 mM Na EDTA). Se calentaron los tubos a 100°C durante 10'. Se centrifugó a 11000 rpm durante 5', se lavó el sedimento en 1ml de dH<sub>2</sub>O y se descartó el sobrenadante. Se sacaron los tapones y se cubrió el tubo con parafilm y se agujereó. Los tubos se congelaron a -20°C durante 2-3h. Seguidamente, los tubos fueron liofilizados durante toda la noche. Al día siguiente se pesó el tubo con el tapón incluido. Al restar el peso del tubo con el sedimento liofilizado al peso del tubo vacío, se obtuvo

el peso seco de la pared celular.

Para la cuantificación de glucano, manano y quitina, la pared celular liofilizada fue hidrolizada con ácido. Se inició la hidrólisis con un máximo de 3mg de peso seco de pared celular. Se añadieron 500µl de ácido trifluoroacético (TFAA) a 2M (Sigma). Se dejaron los tubos tapados a 100°C durante 3h. Pasado este tiempo, se dejaron enfriar durante 5' a temperatura ambiente. Se sacaron los tapones y seguidamente se dejó evaporar el TFAA a 65-70°C en la cabina de humos. Seguidamente, se resuspendió en 1 ml de dH<sub>2</sub>O que se dejó evaporar a 65-70°C, paso que se repitió 2 veces. Finalmente, se resuspendió con 100 µl de dH<sub>2</sub>O por cada mg de peso seco de pared celular, teniendo una concentración final de 10 mg/ml.

Las muestras hidrolizadas se analizaron mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAEC; *high-performance anion-exchange chromatography*) en un sistema de análisis de hidratos de carbono de Dionex (Surrey, Reino Unido). El sistema estaba equipado con un detector electroquímico pulsado ED50 (PED; *pulsed electrochemical detection*), una bomba GS50, y una columna analítica CarboPac PA-1 para la separación de los carbohidratos (4X250 mm), a temperatura ambiente. La columna se equilibró con 100 % de NaOH a 200 mM durante 20' con una tasa de flujo de 0,5 ml/min.

El procesamiento de las muestras fue el siguiente: una vez resuspendidas las muestras con 100 µl de dH<sub>2</sub>O por cada mg de peso seco de pared celular, éstas se centrifugaron a 13000 rpm durante 10'. El sobrenadante se diluyó 1/5 veces directamente en un vial de HPLC. El volumen total en el vial fue de 100 µl. Y el volumen inyectado en la columna fue de 10 µl.

Los carbohidratos detectados y cuantificados por HPLC fueron los monómeros obtenidos a partir de la hidrólisis ácida de la pared celular: glucosa del β-glucano, manosa del manano y glucosamina de la quitina.

La concentración de los distintos componentes fue determinada por calibración a partir de las curvas estándar de monómeros de glucosamina, glucosa y manosa (figura

7). Todos los análisis se hicieron en triplicado. La concentración total de cada uno de los componentes de la pared celular se expresó en  $\mu\text{g}$ , el cual se convirtió a porcentaje del total de los carbohidratos detectados por HPLC.

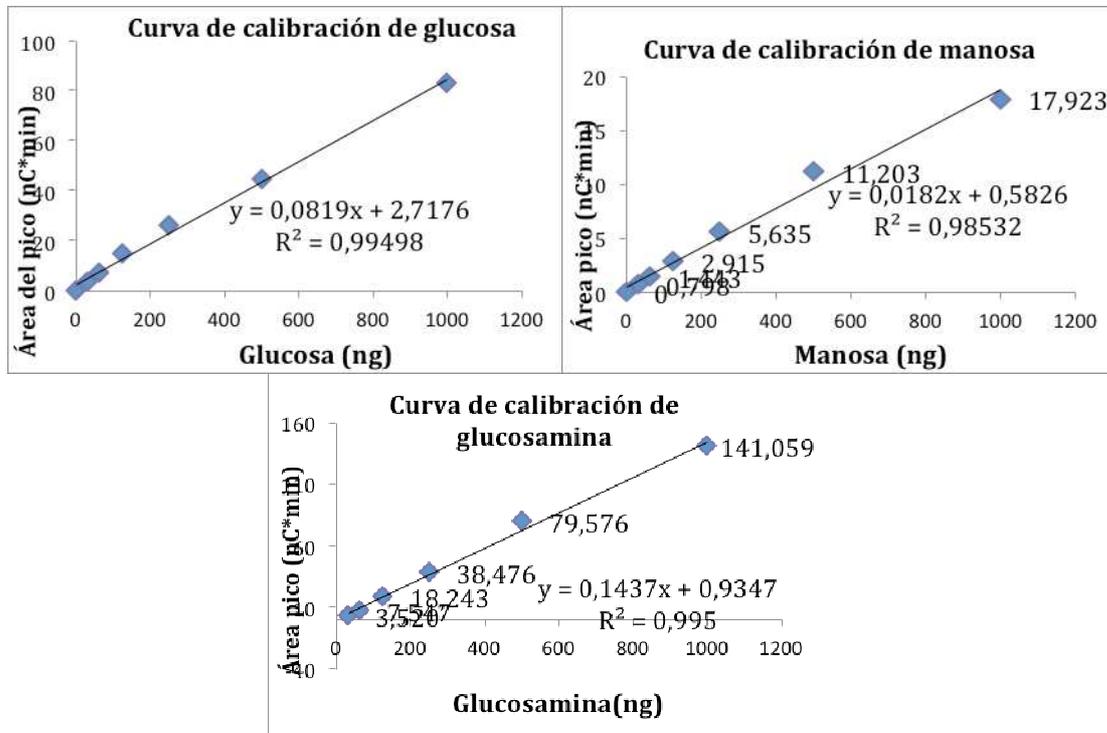


Figura 7. Curvas estándar de calibración de la glucosa, manosa y glucosamina.

### 3.4.2. Efecto de la caspofungina sobre el contenido de quitina basal presente en la pared celular.

#### 3.4.2.1. Preparación del cultivo en presencia de caspofungina

A partir de un cultivo puro de 24 horas en agar glucosado de Sabouraud, se inoculó un caldo YPD (*Yeast Extract-Peptone-Dextrose*) y se incubó toda la noche a 30°C con agitación a 200 rpm. A partir de este cultivo, se inoculó un nuevo caldo de YPD fresco con una concentración de 0,032  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de caspofungina (CFG), ajustando la concentración de la levadura a una densidad óptica (DO) final de 0,2 a 600nm de longitud de onda. Este nuevo cultivo se incubó en agitación a 200 rpm durante 5 h a 30°C y se comprobó que estaba en fase exponencial de crecimiento calculando la DO, la

cual debería estar situada entre valores de 0,6 y 0,8.

### **3.4.2.2. Extracción de la pared celular, hidrólisis ácida y cuantificación de carbohidratos mediante HPLC**

La metodología utilizada para la cuantificación de carbohidratos presentes en la pared celular después del tratamiento con caspofungina es la misma que la detallada en el apartado 3.4.1.2.

### **3.4.3. Análisis de la distribución de quitina en la pared celular**

#### **3.4.3.1. Preparación del cultivo en presencia o ausencia de caspofungina**

Para la preparación de los cultivos se empleó la misma metodología ya descrita en los apartados 3.4.1.1. y 3.4.2.1.

#### **3.4.3.2. Tinción de fluorescencia y microscopía de fluorescencia**

Para poder observar la distribución de la quitina presente en la pared celular de las distintas especies estudiadas, se utilizó el blanco de Calcofluor (CFW; *calcofluor white*), que permite marcar la quitina localizada en el interior de la célula, y la lectina *Wheat Germ Agglutinin* (WGA; *Lectin*, Sigma-Aldrich) unida al Isotiocianato de fluoresceína (FITC), que marca la quitina expuesta en el exterior de la célula.

La metodología utilizada para la tinción de las células de los distintos aislados fue la siguiente. Se separó 1 ml del cultivo de 5h con o sin tratamiento en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó durante 5' a 4600 rpm. Se lavó el sedimento dos veces con dH<sub>2</sub>O para eliminar cualquier exceso de medio. El sedimento fue resuspendido en 190 µl de dH<sub>2</sub>O y 10 µl de WGA-FITC a una concentración de 100 µg/ml. Se dejó actuar durante 45' en la oscuridad a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se hicieron 3 lavados con 1 ml de dH<sub>2</sub>O y se centrifugaron a 13,4 rpm durante 5'. Se volvió a resuspender el sedimento con 198,5 µl de dH<sub>2</sub>O y 1,5 µl de CFW a una concentración de 25 µg/ml y se dejó actuar durante 3' en la oscuridad a temperatura

ambiente. Se llevaron a cabo 3 lavados más. Las células fueron fijadas con 200  $\mu$ l de formalina al 10% (Sigma-Aldrich, Reino Unido) durante 30' en la oscuridad y a temperatura ambiente y después de otros 3 lavados para eliminar el exceso de la solución, el sedimento fue resuspendido con 20  $\mu$ l de 1XPBS y guardado a 4°C hasta su posterior análisis.

Previo al análisis, se transfirieron 5  $\mu$ l de una dilución 1:10 de la muestra guardada a 4°C a un portaobjetos de polilisina, se cubrió con un cubreobjetos y se eliminó el exceso de solución. Se fijó el cubreobjetos mediante el uso de un pintañas transparente y se dejó secar a temperatura ambiente.

Todas las muestras fueron examinadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando el sistema de microscopía DeltaVision RT (Applied Precision, Leeds, UK). Las imágenes fueron capturadas utilizando una cámara CoolSNAP (Photometrics, London, UK), situada dentro de una campana de temperatura constante que rodea el microscopio y que se mantuvo a 37°C.

Las imágenes fueron tomadas en todas las muestras con filtro DIC para el contraste de fases (gris), FITC para la visualización de la fluorescencia emitida por WGA-FITC (verde) y DAPI para el CFW (azul). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

### **3.5. Estudio de clonalidad de aislados de *C. parapsilosis*: búsqueda de genotipos endémicos a lo largo de un periodo de 15 años**

Para estudiar la clonalidad de los distintos aislados de *C. parapsilosis* se llevó a cabo un estudio de tipificación utilizando la técnica de microsátélites o *Short Tandem Repeats* (STRs) en el que se analizaron 4 *loci* diferentes descritos previamente (137).

### 3.5.1. Cepas de *C. parapsilosis* incluidas en el estudio

En el estudio de clonalidad se incluyeron un total de 25 cepas de *C. parapsilosis* y la cepa control ATCC22019.

Seis de estas cepas fueron incluidas en el estudio debido a que presentaron la misma mutación en la región HS1 del gen *FKSI*. Cinco de ellas fueron aisladas en el Hospital de Sant Pau de Barcelona, con una diferencia de 12 años entre la primera y la última, y la otra fue obtenida del estudio FUNGEMYCA. Otras dos cepas incluidas, presentaron la misma mutación en la región HS2 del gen *FKSI*. Además se incluyeron: 11 aislados que presentaban alguna relación espacial y/o temporal (relación que también se daba con tres de las cepas que presentaban la misma mutación en la región HS1 del gen *FKSI*), 4 cepas externas obtenidas del estudio FUNGEMYCA y 2 cepas no sensibles a las equinocandinas aisladas en el Hospital de Sant Pau.

### 3.5.2. Amplificación de los *loci* CP1, CP4, CP6 y B

Para llevar a cabo la amplificación de estas 4 regiones se utilizaron los iniciadores ya descritos y especificados en la Tabla 2. El motivo de repetición de cada uno de los *loci* estudiados es para el CP1 el (AAG)<sub>n</sub>; para el CP4 y CP6 el (AAC)<sub>n</sub>; y para el B el (CA)<sub>n</sub>. Para la amplificación de los *loci* CP1, CP4 y CP6 se utilizó el mismo protocolo, a excepción de la temperatura de hibridación que es específica para cada par de iniciadores y detallados en la Tabla 2. La mezcla de reacción utilizada tenía un volumen total de 25 µl y contenía 2,5 µl de tampón 10x sin magnesio (Roche), 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> a una concentración 25 mM, 2 µl de dNTPs a una concentración de 10 mM, 1,25 µl de cada uno de los iniciadores a una concentración de 5 µM, 0,2 µl de FastStart Taq DNA polimerase a una concentración de 5 U/µl (Roche), 2,5 µl de la extracción de DNA genómico y 13,8 µl de dH<sub>2</sub>O. Las condiciones de amplificación fueron: un primer ciclo de desnaturalización inicial de 2' a 95°C, seguido de 28 ciclos de 30'' a 94°C para la desnaturalización, 30'' a la temperatura determinada para cada par de iniciadores para la hibridación y 1' a 72°C para la extensión. Se incluyó un paso adicional de 7' a 72°C (BioRadi-cycler).

Para la amplificación del *locus* B, el volumen total de la mezcla de reacción fue de 30  $\mu$ l y contenía 3  $\mu$ l de tampón 10x (Roche), 2,5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  a una concentración 25 mM, 2,4  $\mu$ l de dNTPs a una concentración de 10 mM, 1,2  $\mu$ l de cada uno de los iniciadores a una concentración de 5  $\mu$ M, 3  $\mu$ l de la extracción de DNA genómico, 0,5  $\mu$ l de FastStart Taq DNA polimerase a una concentración de 5 U/ $\mu$ l (Roche) y 18,7  $\mu$ l de  $dH_2O$ . Las condiciones de amplificación para este *locus* fueron las mismas que la de los *loci* anteriores.

### 3.5.2. Análisis de los fragmentos obtenidos

Los productos de PCR fueron diluidos 1:10 con  $dH_2O$ . Se añadió 1  $\mu$ l de la alícuota a 13,7  $\mu$ l de formamida y 0,3  $\mu$ l de un estándar de tamaño interno (GenScan 500 6-carboxytetramethylrhodamine [TAMRA]; Applied Biosystems, Inc.). Las muestras fueron desnaturalizadas a 95°C durante 5' y rápidamente enfriadas.

Las muestras fueron corridas en un ABIPRISM 3500 (Applied Biosystems®) con una matriz POP7 y un capilar de 50 cm. El análisis de los fragmentos se hizo mediante el software GeneMapper® Software v3.7 (Applied Biosystems®). Ya que los *loci* CP1, CP4 y CP6 estaban marcados con diferentes fluoróforos, los amplificados de estas 3 regiones se analizaron conjuntamente. El *locus* B se analizó por separado.

*C. parapsilosis* es una especie diploide por lo que se obtuvieron uno o dos fragmentos de PCR por cada *locus* para cada cepa (Figura 8). Así pues cada fragmento fue asignado a un alelo. Las cepas que mostraron dos productos de PCR se consideraron heterocigotas, mientras que las cepas que presentaron un solo producto de amplificación se consideraron homocigotas para dicho *locus*. Las distintas cepas fueron consideradas la misma cuando éstas presentaron exactamente los mismos alelos para los 4 *loci*. En el caso de que hubiera un único alelo de los 8 analizados que fuera distinto y que la diferencia en la longitud fuera igual o menor a 4 repeticiones se consideraron distintas cepas pero clonalmente relacionadas.

El poder discriminatorio (PD) de la técnica se determinó matemáticamente mediante el cálculo del Índice de Diversidad de Simpson utilizando la fórmula:

$$PD = 1 - \left( \sum_{i=1}^s n_i (n_i - 1) \right) / N (N - 1)$$

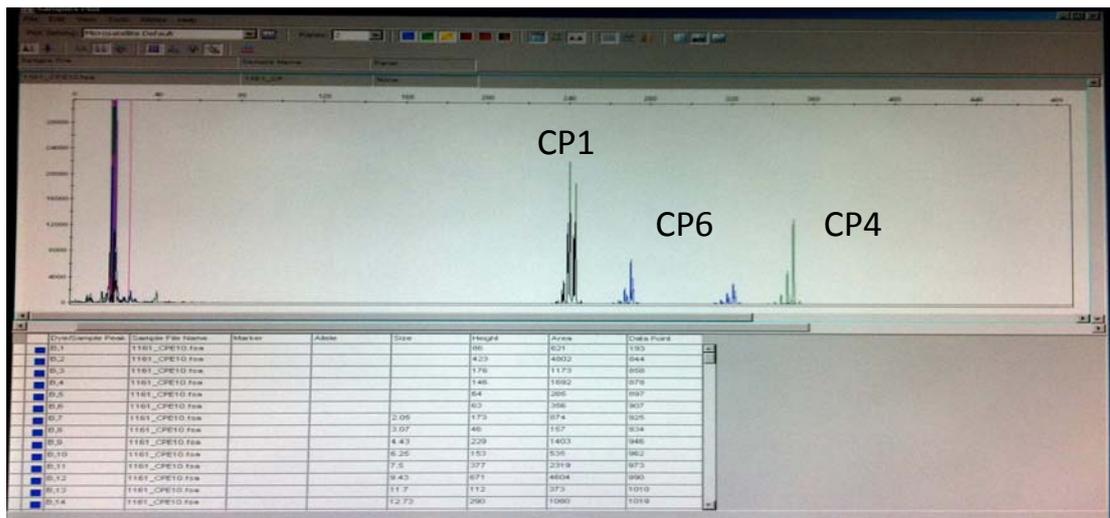
Donde:

N = número total de aislados

S = número total de genotipos

$n_i$  = número total de aislados incluidos en el genotipo i.

Así, un PD de 1 indica que el método utilizado permite diferenciar todos los aislados de la población estudiada, mientras que un PD de 0 indicará que todos los aislados estudiados pertenecen al mismo genotipo.



**Figura 8.** Análisis de los fragmentos amplificados de los *loci* CP1, CP4 y CP6. Se muestra una cepa de *C. parapsilosis* homocigótica para los *loci* CP1 y CP4 y heterocigótica para el *locus* CP6.

### 3.6. Análisis estadístico

Para la realización de los distintos estudios estadísticos se utilizó el paquete de programas estadísticos SPSS para Windows en la versión V22.0. En todos los casos el error tipo alfa se fijó a 0,05.

**Estudio epidemiológico de las fungemias:** se utilizó la prueba Chi-cuadrado y el Test exacto de Fisher para detectar diferencias en el género, la edad de los pacientes y la distribución de las especies por año de estudio. Mientras que para detectar diferencias en las CIM de los 9 antifúngicos a lo largo de los años se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test de Mann-Whitney.

**Análisis de los niveles de quitina:** para detectar diferencias en los niveles de quitina entre las distintas especies estudiadas, así como entre los aislados sensibles y no sensibles de *C. parapsilosis*, se llevó a cabo el análisis de varianza de un factor (ANOVA), seguido de una prueba post-hoc en el caso de que se detectaran diferencias significativas una vez hecha la ANOVA. Para determinar si había diferencias entre los niveles basales de quitina entre las 3 especies de *C. parapsilosis complex* y la cepa control SC5314 de *C. albicans*, se llevó a cabo la prueba T de Student de muestra única, en la que se utilizó el porcentaje de quitina basal de *C. albicans* como muestra única. Para determinar diferencias en los niveles de quitina basales y después de un tratamiento con CFG, entre las diferentes especies estudiadas, se llevó a cabo un análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA).

**Tabla 2.** Secuencia nucleotídica de los iniciadores utilizados en este estudio. Temperaturas de hibridación (Th), longitud de los fragmentos amplificados en pares de bases (pb) y técnica en la que se ha utilizado cada uno de ellos.

| Iniciadores | Secuencia (5'--> 3')        | Th (°C) | Longitud fragmento amplificado (pb) | Técnica   |
|-------------|-----------------------------|---------|-------------------------------------|---|
| ITS-1 F     | TCCGTAGGTGAACCTGCGG         | 55      | 500                                 | Discriminación molecular entre especies del complejo <i>C. parapsilosis</i>   |
| ITS-4 R     | TCCTCCGCTTATTGATATGC        |         |                                     |   |
| Ouf1h1-F    | AATGGGCTGGTGCTCAACAT        | 55      | 770                                 | Análisis gen <i>FKS1</i> en <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i> |
| Ouf1h1-R    | CCTTCAATTCAGATGGAACCTTGATG  |         |                                     |   |
| Ouf1h2-F    | AAGATTGGTGCGGTATGGG         | 53      | 607                                 |   |
| Ouf1h2-R    | TAAGGTCTTGCCAATGAG          |         |                                     |   |
| CPf2h1-F    | CCAACCGCAAATACTTACC         | 50      | 583                                 | Análisis gen <i>FKS2</i> en <i>C. parapsilosis</i>  |
| CPf2h1-R    | AATGATGCCTCCTTCTTGAC        |         |                                     |   |
| CPf2h2-F    | TATGCAATGCGGTAAAGGAC        | 51      | 630                                 |   |
| CPf2h2-R    | CTCCACGGCAAATCTTGAG         |         |                                     |   |
| CKf1h1-F    | ACTGCATCGTTTGCTCCTCT        | 50      | 481                                 | Análisis gen <i>FKS1</i> en <i>C. krusei</i>  |
| CKf1h1-R    | GAACATGATCAATTGCCAC         |         |                                     |   |
| CKf1h2-F    | CCGGTATGGGAGAACAAAT         | 51      | 473                                 |   |
| CKf1h2-R    | CACCACCAATGGAAACATCA        |         |                                     |   |
| CGf1h1-F    | CCATTGGGTGGTCTGTTCACG       | 58      | 725                                 | Análisis genes <i>FKS1</i> y <i>FKS2</i> en <i>C. glabrata</i>  |
| CGf1h1-R    | GATTGGGCAAAGAAAAGAAATACGAC  |         |                                     |   |
| CGf1h2-F    | GGTATTTCAAAGGCTCAAAGGG      | 58      | 834                                 |   |
| CGf1h2-R    | ATGGAGAGAACAGCAGGGCG        |         |                                     |   |
| CGf2h1-F    | GCTTCTCAGACTTTCACCG         | 56      | 747                                 |   |
| CGf2h1-R    | CAGAATAGTGTGGAGTCAGACG      |         |                                     |   |
| CGf2h2-F    | TCTTGACTTTCTACTATGCG        | 54      | 549                                 |   |
| CGf2h2-R    | CTTGCCAATGTGCCACTG          |         |                                     |   |
| CP1-F-NED   | NED-AAAGTGCTACACACGCATCG    | 55      | ≈ 248 (en función de la cepa)       | Estudio de clonalidad en aislados de <i>C. parapsilosis</i>   |
| CP1-R       | GGCTTGCAATTCATTTCCT         |         |                                     |   |
| CP4-F-VIC   | VIC- CAAATCATCCAGCTTCAAACC  | 55      | ≈ 316 (en función de la cepa)       |   |
| CP4-R       | CATCAAACAAGAATTCGATATCAC    |         |                                     |   |
| CP6-F-6-FAM | FAM- CAGGAACAGGACAATGGTGA   | 60      | ≈ 296 (en función de la cepa)       |   |
| CP6-R       | TCTGGAGCCTCTAGGACGTTT       |         |                                     |   |
| B-F-6-FAM   | FAM-AGGTTTGTAGTAGTGCCCTATGG | 60      | ≈ 150 (en función de la cepa)       |   |
| B-R         | TATCTCTCTCGCCATTTGAACG      |         |                                     |   |

## **4. RESULTADOS**

---



## 4.1. Epidemiología de las fungemias en un Hospital Universitario a lo largo de 15 años: relevancia de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*

### 4.1.1. Incidencia y distribución de las fungemias

A lo largo de los 15 años del estudio, se identificaron un total de 360 aislados obtenidos de 350 episodios de fungemia causados en 343 pacientes. Diez episodios fueron causados por más de una especie y 7 pacientes presentaron dos episodios diferentes.

En la Tabla 3 se muestra la distribución de las especies a lo largo del periodo de estudio. La especie más frecuentemente aislada fue *C. albicans* (155 aislados; 43,1%), seguida de *C. parapsilosis* (72 aislados; 20,0%), *C. tropicalis* (52 aislados; 14,4%), *C. glabrata* (42 aislados; 11,7%), *Candida lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*) (5 aislados; 1,4%), y *C. krusei* (4 aislados; 1,1%). Seis episodios de fungemia fueron causados por especies de *Candida* poco frecuentes (1 *C. rugosa*, 1 *C. dubliniensis*, 1 *C. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*), 1 *C. lipolytica* (*Yarrowia lipolytica*), y 2 *C. kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*). En otros 21 episodios se aislaron levaduras no relacionadas con el género *Candida*, 1 *Rhodotorula* spp., 1 *Geotrichum beigeli*, 1 *Wickerhamomyces anomalus* (*Hansenula anomala*), 5 *Saprochaete capitata* (*Blastoschizomyces capitatus*), y 13 *Cryptococcus neoformans*. También se diagnosticaron dos episodios causados por hongos dimórficos, 1 por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* y 1 por *Talaromyces marneffe* (*Penicillium marneffe*), y 1 episodio causado por el hongo filamentosos *Fusarium* spp..

A pesar de que casi todos los episodios de fungemia fueron causados por una única especie, en 10 casos (2,9%) se detectó un episodio de fungemia mixto: *C. albicans* + *C. glabrata* (5 episodios; 50,0%), *C. albicans* + *C. parapsilosis* (3 episodios; 30,0%), *C. albicans* + *C. tropicalis* (1 episodio; 10,0%), y *C. lusitaniae* + *S. capitata* (1 episodio; 10,0%).

En relación al número de episodios de candidemia detectados en el periodo de tiempo comentado con anterioridad, se observó que entre los años 1997 y 2005, la

incidencia de los episodios de candidemia mostró las ligeras variaciones esperadas entre años. No obstante, la incidencia de 6,2 casos de candidemia/100.000 habitantes detectada en 2006 decreció a 5,2 casos/100,000 habitantes en 2007, a 5,0 casos/100,000 habitantes en 2008, y a 3,3 casos/100,000 habitantes en 2009. En el año 2010, la incidencia de la candidemia volvió a aumentar hasta 4,3 casos/100.000 habitantes y en el 2011 incrementó hasta 7,4 casos/100.000 habitantes, año en que se alcanzó la incidencia más elevada de todo el periodo de estudio. Estas diferencias no mostraron significación estadística ( $p=0,294$ ), pero se pudo constatar que existía una tendencia hacia el incremento, con un aumento promedio de 0,05 casos por 100.000 habitantes y año de estudio.

*C. albicans* fue la especie más frecuentemente aislada en todo el periodo de estudio, no obstante, se pueden diferenciar dos periodos con respecto a su frecuencia ( $p=0,001$ ). En el primer periodo, del 1998 al 2001, el 50% de los casos de fungemia fueron causados por *C. albicans*, mientras que en el segundo periodo, del 2002 al 2010, tan solo el 40% de las fungemias fueron causadas por *C. albicans*. En el año 2011, la frecuencia de *C. albicans* incrementó de nuevo, estando implicada en el 50% de las fungemias. *C. parapsilosis* fue identificada como la segunda especie más común causante de fungemia a lo largo de todo el periodo de estudio, (a excepción de los años 1997, 1998 y 2008), con unos porcentajes que variaron del 8,7% en 2008 al 29,2% en 2003. Las diferencias en la distribución de *C. parapsilosis* a lo largo de los años no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,738$ ), pero la prevalencia de *C. parapsilosis* incrementó a lo largo de los años en un promedio de 0,33% por año.

La frecuencia de *C. tropicalis* y *C. glabrata* también fluctuó durante el periodo de estudio, variando entre el 4,8% de 2010 y el 26,1% de 2008 y entre el 0% de 2005 y el 25% de 2004, respectivamente. Entre los años 2009 y 2011, la prevalencia de *C. tropicalis* disminuyó en comparación con la de los años anteriores. Esta reducción estuvo relacionada con un incremento en la frecuencia de *C. glabrata*, la cual presentó porcentajes más elevados que los de *C. tropicalis* en los últimos 3 años del estudio ( $p=0,09$ ).

**Tabla 3.** Distribución por especies de los 360 aislados de hemocultivos causantes de fungemia en los 343 pacientes diagnosticados en el Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau de Barcelona entre 1997 y 2011.

| Especie aislada                                | Año (nº de aislados (%)) |           |          |           |           |          |          |           |           |           |          |           |          |          |          |            |
|--|--------------------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|----------|------------|
|  | 1997                     | 1998      | 1999     | 2000      | 2001      | 2002     | 2003     | 2004      | 2005      | 2006      | 2007     | 2008      | 2009     | 2010     | 2011     | Total      |
| <i>C. albicans</i>                             | 6 (33,3)                 | 16 (51,6) | 7 (43,8) | 10 (52,6) | 14 (53,8) | 9 (37,5) | 9 (37,5) | 12 (42,9) | 13 (48,1) | 11 (36,7) | 9 (36)   | 10 (43,5) | 6 (37,5) | 7 (33,3) | 16 (50)  | 155 (43,1) |
| <i>C. parapsilosis</i>                         | 2 (11,1)                 | 5 (16,1)  | 4 (25)   | 5 (26,3)  | 4 (15,4)  | 3 (12,5) | 7 (29,2) | 5 (17,9)  | 6 (22,2)  | 7 (23,3)  | 6 (24)   | 2 (8,7)   | 4 (25)   | 5 (23,8) | 7 (21,9) | 72 (20)    |
| <i>C. tropicalis</i>                           | 3 (16,7)                 | 7 (22,6)  | 4 (25)   | 1 (5,3)   | 3 (11,5)  | 3 (12,5) | 5 (20,8) | 2 (7,1)   | 4 (14,8)  | 5 (16,7)  | 4 (16)   | 6 (26,1)  | 1 (6,3)  | 1 (4,8)  | 3 (9,4)  | 52 (14,4)  |
| <i>C. glabrata</i>                             | 3 (16,7)                 | 1 (3,2)   | 1 (6,3)  | 3 (15,8)  | 2 (7,7)   | 3 (12,5) | 2 (8,3)  | 7 (25)    |           | 3 (10)    | 4 (16)   | 3 (13)    | 3 (18,8) | 3 (14,3) | 4 (12,5) | 42 (11,7)  |
| <i>C. lusitanae</i>                            |                          |           |          |           |           | 1 (4,2)  |          |           | 2 (7,4)   | 1 (3,3)   |          |           |          | 1 (4,8)  |          | 5 (1,4)    |
| <i>C. krusei</i>                               |                          | 1 (3,2)   |          |           |           |          |          | 1 (3,6)   |           |           |          | 1 (4,3)   | 1 (6,3)  |          |          | 4 (1,1)    |
| Otras especies de <i>Candida</i> <sup>a</sup>  | 2 (11,1)                 |           |          |           |           | 1 (4,2)  |          |           |           | 1 (3,3)   |          |           |          | 1 (4,8)  | 1 (3,1)  | 6 (1,7)    |
| Otras levaduras no <i>Candida</i> <sup>b</sup> | 2 (11,1)                 | 1 (3,2)   |          |           | 3 (11,5)  | 4 (16,7) | 1 (4,2)  | 1 (3,6)   | 2 (7,4)   | 1 (3,3)   | 2 (8)    | 1 (4,3)   | 1 (6,3)  | 2 (9,5)  |          | 21 (5,8)   |
| Hongos dimórficos/filamentosos <sup>c</sup>    |                          |           |          |           |           |          |          |           |           | 1 (3,3)   |          |           |          | 1 (4,8)  | 1 (3,1)  | 3 (0,8)    |
| Total  | 18 (5,0)                 | 31 (8,6)  | 16 (4,4) | 19 (5,3)  | 26 (7,2)  | 24 (6,7) | 24 (6,7) | 28 (7,8)  | 27 (7,5)  | 30 (8,3)  | 25 (6,9) | 23 (6,4)  | 16 (4,4) | 21 (5,8) | 32 (8,9) | 360 (100)  |
| Fungemias mixtas                               |                          |           |          | 1         |           | 1        | 1        | 2         |           | 2         | 1        | 1         | 1        |          |          | 10 (2,9)   |

<sup>a</sup> Otras especies de *Candida* son las siguientes: *C. rugosa* (1 aislado), *C. guilliermondii* (1 aislado), *C. dubliniensis* (1 aislado), *C. lipolytica* (1 aislado), *C. kefyr* (2 aislados).

<sup>b</sup> Otras levaduras no *Candida* son las siguientes: *Rhodotorula* spp.(1 aislado), *Geotrichum beigelii* (1 aislado), *Wickerhamomyces anomalus* (1 aislado), *Saprochaete capitata* (5 aislados), *Cryptococcus neoformans* (13 aislados)

<sup>c</sup> Hongos dimórficos/filamentosos son los siguientes: *Histoplasma capsulatum* (1 aislado), *Penicillium marneffeii* (1 aislado), *Fusarium* spp. (1 aislado)

#### 4.1.2. Datos demográficos de los pacientes con candidemia

En la Tabla 4 se muestra la distribución de las distintas especies de *Candida* en función del grupo de edad de los pacientes, detectándose diferencias significativas en la frecuencia de algunas especies de *Candida* entre algunos de los grupos de edad.

Así, el número de episodios de candidemia causados por *C. parapsilosis* varió significativamente entre los 4 grupos de edad establecidos ( $p = 0,001$ ), siendo la especie más comúnmente aislada en los grupos de edad de los niños  $\leq 1$  año (66,7%) y en los de 2-14 años (50%), mientras que en los otros dos grupos fue significativamente menos frecuente, siendo el agente del 13,2% de las candidemias en el grupo de 15 – 64 años y del 15,1% en el grupo de los  $\geq 65$  años.

*C. albicans* fue la segunda especie con más frecuencia aislada en los grupos de edad de los  $\leq 1$  año y de los de 2 - 14 años, representando el 29,2% y 37,5% de los casos de candidemia, respectivamente. En los otros dos grupos, fue la especie aislada con mayor frecuencia, con un 43,9% de los casos en el grupo de los de 15 – 64 y un 51,8% en el grupo de los  $\geq 65$  años.

Solo se identificó un caso de candidemia por *C. tropicalis* en los  $\leq 1$  año y otro en los de 2 - 14 años, pero fue la segunda especie en cuanto a frecuencia en los otros dos grupos de edad, representando el 20,2% de las candidemias en el grupo de los 15 - 64 años y el 16,3% en el grupo de los  $\geq 65$  años.

No se detectaron casos de candidemia por *C. glabrata* en los  $\leq 1$  año y solo un caso en el grupo de los de 2 - 14 años, pero su frecuencia fue significativamente superior ( $p < 0,001$ ) en los otros dos grupos de edad, representado el 14,9% de las candidemias en el grupo de los de 15 - 64 años (tercer lugar en orden de frecuencia) y el 14,5% en el grupo de los  $\geq 65$  años (cuarto lugar en orden de frecuencia).

Al analizar la distribución de los episodios de candidemia en relación con el sexo, se observó una mayor frecuencia de casos en los hombres (62.8%) que en las mujeres (37.2%) ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 4.** Distribución de las especies de *Candida* por grupos de edad.

| Especies de <i>Candida</i>                    | ≤1             |                | 2-14           |                | 15-64          |                | ≥65            |                | Total aislados |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|   | Nº de aislados | % <sup>a</sup> |                |
| <i>C. albicans</i>                            | 7              | 29,2           | 12             | 37,5           | 50             | 43,9           | 86             | 51,8           | 155            |
| <i>C. parapsilosis</i>                        | 16             | 66,7           | 16             | 50,0           | 15             | 13,2           | 25             | 15,1           | 72             |
| <i>C. tropicalis</i>                          | 1              | 4,2            | 1              | 3,1            | 23             | 20,2           | 27             | 16,3           | 52             |
| <i>C. glabrata</i>                            | 0              | 0,0            | 1              | 3,1            | 17             | 14,9           | 24             | 14,5           | 42             |
| <i>C. lusitaniae</i>                          | 0              | 0,0            | 0              | 0,0            | 3              | 2,6            | 2              | 1,2            | 5              |
| <i>C. krusei</i>                              | 0              | 0,0            | 1              | 3,1            | 3              | 2,6            | 0              | 0,0            | 4              |
| Otras especies de <i>Candida</i> <sup>b</sup> | 0              | 0,0            | 1              | 3,1            | 3              | 2,6            | 2              | 1,2            | 6              |
| Total   | 24             | 7,1            | 32             | 9,5            | 114            | 33,9           | 166            | 49,4           | 336            |

<sup>a</sup> % de aislados en el grupo de edad indicado

<sup>b</sup> Las otras especies de *Candida* son las siguientes: *C. rugosa* (1 aislado), *C. guilliermondii* (1 aislado), *C. dubliniensis* (1 aislado), *C. lipolytica* (1 aislado), *C. kefyr* (2 aislados).

#### 4.1.3. Identificación molecular de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*

De los 72 aislados de *C. parapsilosis complex* causantes de fungemia, en 68 de ellos se pudo confirmar la identificación mediante técnicas moleculares y en cuatro no fue posible por falta de crecimiento al ser resembrados.

Sesenta y siete de los aislados fueron identificados como *C. parapsilosis* (98,5%) y un único aislado fue identificado como *C. orthopsilosis* (1,5%), por lo que la prevalencia total de *C. orthopsilosis* causante de fungemia fue tan solo del 0,3%. Ninguna de los aislados fue identificado como *C. metapsilosis*.

## **4.2. Estudio de sensibilidad *in vitro* en *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* y otras especies relevantes de *Candida***

### **4.2.1. Estudio de la de sensibilidad *in vitro* frente a 9 agentes antifúngicos en aislados de *C. parapsilosis complex* causantes de fungemia (1997-2011)**

La Tabla 5 resume los resultados obtenidos del estudio de sensibilidad *in vitro* de los 68 aislados de *C. parapsilosis* frente a 9 agentes antifúngicos, presentándose para cada uno de ellos la media geométrica (MG) de la concentración inhibitoria mínima (CIM), el rango de CIM, la CIM<sub>90</sub>, la CIM<sub>50</sub> y el porcentaje de cepas sensibles.

Empleando los nuevos puntos de corte específicos para especie (*species specific Clinical Breakpoints*; ssCBP) y los puntos de corte epidemiológicos (*Epidemiological Cut-off Values*; ECVs) mencionados en el apartado de material y métodos, el 100% de los aislados de *C. parapsilosis* fueron sensibles a anidulafungina (AFG), micafungina (MFG), 5-fluocitosina (5FC), anfotericina B (AMB) y posaconazol (POS).

El porcentaje de cepas sensibles a caspofungina (CFG), voriconazol (VRC), fluconazol (FLC), e itraconazol (ITC) fue del 98,5%, 97,1%, 95,6, y 76,5%, respectivamente.

Solo tres aislados fueron resistentes al FLC ( $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ ). De éstos, 2 fueron además sensible dosis dependientes (SDD) al VRC (0,25 – 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) y el tercero fue SDD al ITC (0,25 – 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) y presentó una sensibilidad intermedia a la CFG (4  $\mu\text{g/ml}$ ). Otros 15 aislados fueron SDD al ITC (CIM<sub>90</sub> 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ).

El único aislado de *C. orthopsilosis* identificado fue sensible a todos los agentes antifúngicos estudiados.

Con respecto a las equinocandinas, los valores de MG de la CIM, de CIM<sub>50</sub>, y de CIM<sub>90</sub> de la CFG (0,41, 0,5, y 1, respectivamente) fueron menores que los valores obtenidos para la MFG (1,18, 1, y 2, respectivamente) y para la AFG (1,06, 1, y 2, respectivamente).

Cuando la sensibilidad de los aislados fue comparada en función de los 4 grupos de edad establecidos, no se observaron diferencias significativas en los valores de la MG de la CIM para ninguno de los antifúngicos testados. No obstante, dos de los 3 aislados resistentes al FLC y 4 de los 16 aislados SDD al ITC fueron identificados en pacientes menores de 15 años.

Al comparar los valores de la MG de la CIM a lo largo de los 15 años del periodo de estudio, éstos se mantuvieron estables para todos los antifúngicos analizados.

**Tabla 5.** Resultados del análisis de sensibilidad *in vitro* de los 68 aislados de *C. parapsilosis complex* frente a 9 agentes antifúngicos.

| Agente antifúngico | MG CIM (µg/ml) | Rango CIM   | CIM <sub>50</sub> | CIM <sub>90</sub> | Porcentaje de cepas sensibles <sup>a</sup> |
|--------------------|----------------|-------------|-------------------|-------------------|--|
| Anidulafungina     | 1,06           | 0,25-2      | 1                 | 2                 | 100  |
| Micafungina        | 1,18           | 0,125-2     | 1                 | 2                 | 100  |
| Caspofungina       | 0,41           | 0,06-4      | 0,5               | 1                 | 98,5                                       |
| 5-Fluorocitosina   | 0,07           | <0,06-0,5   | <0,06             | 0,125             | 100  |
| Anfotericina B     | 0,04           | 0,016-0,5   | 0,016             | 0,25              | 100  |
| Posaconazol        | 0,05           | 0,008-0,25  | 0,06              | 0,125             | 100  |
| Voriconazol        | 0,01           | <0,008-0,25 | 0,016             | 0,03              | 97,1                                       |
| Itraconazol        | 0,10           | 0,016-0,5   | 0,125             | 0,25              | 76,5                                       |
| Fluconazol         | 1,00           | 0,025-32    | 1                 | 2                 | 95,6                                       |

CIM, concentración mínima inhibitoria; MG CIM, media geométrica de la CIM.

<sup>a</sup> Los puntos de corte utilizados para definir las cepas sensibles fueron los siguientes: para la anidulafungina  $\leq 2$  µg/ml, para la micafungina  $\leq 2$  µg/ml, para la caspofungina  $\leq 2$  µg/ml, para la 5-fluorocitosina  $\leq 4$  µg/ml, para la anfotericina B  $\leq 1$  µg/ml, para el posaconazol  $\leq 1$  µg/ml, para el voriconazol  $\leq 0,12$  µg/ml, para el itraconazol  $\leq 0,12$  µg/ml y para el fluconazol  $\leq 2$  µg/ml.

#### 4.2.2. Patrón de sensibilidad a las equinocandinas en aislados de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*

Tal y como se ha podido observar en el apartado anterior, la prevalencia de cepas de *C. parapsilosis* no sensibles a las equinocandinas ha sido muy baja. De acuerdo con los nuevos CBP específicos para especie, de los 77 aislados de *C. parapsilosis* estudiados (72 procedentes de los casos de fungemias diagnosticados en nuestro centro entre los años 1997-2012 y 5 cedidos por otros investigadores), solo 6 fueron considerados no sensibles como mínimo a una de las 3 equinocandinas (Tabla 6).

Cuatro de estos 6 aislados no sensibles mostraron una CIM= 4 µg/ml para la AFG, quedando clasificados como intermedios, dos de ellos fueron además clasificados como intermedios a la MFG (CIM = 4 µg/ml), y un tercero como resistente a la MFG (CIM = 8 µg/ml). Un quinto aislado mostró una CIM = 8 µg/ml para la AFG y una CIM = 4 µg/ml para la MFG, siendo clasificado como resistente e intermedio, respectivamente. El sexto aislado mostró una CIM = 4 µg/ml para la CFG, siendo el único aislado considerado no sensible a este antifúngico.

Los 4 aislados de *C. orthopsilosis* y los 3 de *C. metapsilosis* incluidos en el estudio fueron sensibles a las 3 equinocandinas, con una CIM ≤ 0,5 µg/ml para los 3 antifúngicos, a excepción de un único aislado de *C. orthopsilosis* que presentó valores de CIM = 1 µg/ml para la AFG y la MFG (Tabla 6).

Cuando se compararon los valores de la CIM frente a las 3 equinocandinas entre las 3 especies que componen el complejo *C. parapsilosis*, se observó que las CIM frente a la CFG eran similares entre todas ellas. No obstante, en el caso de la MFG y la AFG existían diferencias. El 90,9% de los aislados de *C. parapsilosis* presentaron valores de CIM para la AFG de ≥ 1µg/ml, por el contrario, el 100% aislados de *C. metapsilosis* y 75% aislados de *C. orthopsilosis* presentan valores de CIM ≤ 0,5µg/ml. Con respecto a la MFG, el 97,4% de los aislados de *C. parapsilosis* presentaron valores de CIM ≥ 1 µg/ml, a diferencia de los aislados de *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* en los que el 100% y el 75% de los aislados respectivamente, presentaron valores de CIM ≤ 0,5 µg/ml.

#### **4.2.3. Patrón de sensibilidad a las equinocandinas en otras especies del género *Candida* incluidas en el estudio**

De los 12 aislados de *C. glabrata* no sensibles al menos a una equinocandina que fueron incluidos en el estudio, el 75% de ellos (9/12) fueron resistentes a la CFG (CIM = 0,5 – 8 µg/ml). De éstos, 3 aislados presentaron además una sensibilidad intermedia a la AFG (CIM = 0,25 µg/ml), y otros dos fueron también clasificados como resistentes a la MFG (CIM = 1, 4 µg/ml) y a la AFG (CIM = 1, 2 µg/ml). Un único

aislado fue resistente a la AFG (CIM = 2 µg/ml) y a la MFG (CIM = 1 µg/ml) y sensible a la CFG (CIM = 0,12 µg/ml). Otros dos aislados presentaron una sensibilidad intermedia a la CFG (CIM = 0,25 µg/ml) y fueron sensibles a la AFG y a la MFG (Tabla 6).

De los 13 aislados de *C. krusei* incluidos en el estudio, 6 lo fueron por ser sensibles a las 3 equinocandinas, con rangos de CIM de 0,13-0,25 µg/ml para la CFG, <0,016-0,125 µg/ml para la AFG y de 0,06-0,125 para la MFG µg/ml; y los otros 7 por ser resistentes a alguna de las tres equinocandinas. De estos últimos, el 86% (6/7) fueron clasificados como resistentes a la CFG (CIM = 1 - 4 µg/ml), uno de ellos fue además resistente a la MFG (CIM = 1 µg/ml) e intermedio a la AFG (CIM = 0,5 µg/ml) y el séptimo aislado fue clasificado como intermedio a la CFG (CIM= 0,5 µg/ml) (Tabla 6).

Los cinco aislados de *C. albicans* fueron considerados no sensibles a la CFG, pero sensibles a la AFG y a la MFG (Tabla 6). Dos de ellos presentaron una CIM de 0,5 µg/ml siendo clasificados como intermedios y los 3 restantes fueron resistentes presentando una CIM de 1 µg/ml.

De los 4 aislados de *C. tropicalis* analizados (Tabla 6), dos fueron resistentes a la AFG (CIM = 2, 8 µg/ml) y uno de ellos fue además resistente a la MFG (CIM = 8 µg/ml). Los otros dos aislados fueron resistentes a la CFG, presentando una CIM de 1 µg/ml.

**Tabla 6.** Resultados del estudio de sensibilidad *in vitro* a las equinocandinas de las siete especies de *Candida*.

| Especie                 | Cepa <sup>a</sup>  | CIM (µg/ml) <sup>b</sup> |        |      |
|-------------------------|--------------------|--------------------------|--------|------|
|                         |                    | AFG                      | MFG    | CFG  |
| <i>C. parapsilosis</i>  | 1161LL             | 4                        | 4      | 1    |
|                         | 928LL              | 2                        | 2      | 4    |
|                         | ST-14 <sup>a</sup> | 8                        | 4      | 1    |
|                         | RS-16              | 4                        | 8      | 2    |
|                         | CP-368             | 4                        | 1      | 0,5  |
|                         | CP-372             | 4                        | 4      | 2    |
| <i>C. orthopsilosis</i> | 974LL              | 1                        | 1      | 0,25 |
|                         | 81/026             | 0,5                      | 0,5    | 0,5  |
|                         | 02-212             | 0,5                      | 0,25   | 0,25 |
|                         | AM2005/0300        | 0,25                     | 0,25   | 0,25 |
| <i>C. metapsilosis</i>  | J960161            | 0,5                      | 0,5    | 0,5  |
|                         | AM2005/0301        | 0,25                     | 0,5    | 0,25 |
|                         | AM2005/0299        | 0,125                    | 0,5    | 0,25 |
| <i>C. glabrata</i>      | 912LL              | 0,125                    | 0,016  | 0,5  |
|                         | 913LL              | 0,06                     | <0,008 | 0,25 |
|                         | 982LL              | 0,03                     | <0,008 | 2    |
|                         | 1119LL             | 0,06                     | <0,008 | 0,25 |
|                         | B1113              | 0,125                    | 0,016  | 0,5  |
|                         | M1105              | 2                        | 4      | 8    |
|                         | CS-52              | 1                        | 1      | 1    |
|                         | 1176LL             | 0,25                     | 0,06   | 0,5  |
|                         | CG-31              | 0,125                    | 0,016  | 1    |
|                         | CG-65              | 0,25                     | 0,016  | 1    |
|                         | CG-68              | 2                        | 1      | 0,12 |
|                         | CG-74              | 0,25                     | 0,016  | 1    |
| <i>C. krusei</i>        | 966LL              | 0,03                     | 0,06   | 0,5  |
|                         | CY-118             | 0,5                      | 1      | 4    |
|                         | CK-8               | 0,03                     | 0,25   | 2    |
|                         | CK-45              | 0,12                     | 2      | 1    |
|                         | EU-123             | 0,12                     | 0,12   | 2    |
|                         | EU-220             | 0,12                     | 0,25   | 2    |
|                         | GIMI-75            | 0,125                    | 0,125  | 2    |
| <i>C. albicans</i>      | 894LL              | 0,016                    | <0,008 | 0,5  |
|                         | 896LL              | 0,03                     | 0,016  | 0,5  |
|                         | CA-19              | 0,016                    | 0,016  | 1    |
|                         | CA-253             | 0,03                     | 0,016  | 1    |
|                         | CA-429             | 0,016                    | 0,016  | 1    |
| <i>C. tropicalis</i>    | RS-14              | 8                        | 8      | 0,25 |
|                         | CAT-60             | 0,016                    | 0,016  | 1    |
|                         | CAT-64             | 2                        | 0,016  | 0,03 |
|                         | CAT-76             | 0,016                    | 0,12   | 1    |

<sup>a</sup> Se muestran los resultados de las cepas no sensibles a excepción de los aislados de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* de los que se muestran los resultados de los 7 aislados incluidos en el estudio.

<sup>b</sup> Casillas rojas indican CIM interpretadas como R, casillas amarillas indica CIM interpretadas como I.

### 4.3. Resistencia a las equinocandinas en *C. parapsilosis complex* por modificación de la diana de acción: análisis de las regiones HS1 y HS2 de los genes *FKS1* y *FKS2*

#### 4.3.1. *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*

Todos los aislados de *C. parapsilosis complex* analizados presentaban la sustitución aminoacídica de una prolina por una alanina en la posición 660 de Fks1p descrita con anterioridad (Tabla 7) (163) y característica de las especies de este complejo. A pesar del amplio rango de CIM obtenidos para las 3 equinocandinas, ninguno de los 77 aislados de *C. parapsilosis* estudiados presentó ninguna otra mutación en ninguna de las dos regiones HS1 o HS2 del gen *FKS1*, ni siquiera los aislados que presentaban CIM elevadas (Tabla 8). No obstante, un total de 11 de los 77 aislados analizados de *C. parapsilosis* (14.3%) presentó una mutación nucleotídica fuera de las regiones HS del gen *FKS1*. De las 11 mutaciones, 6 fueron detectadas en un único alelo (heterocigóticas), mientras que las 5 mutaciones restantes fueron identificadas en ambos alelos (homocigóticas). Las 11 mutaciones nucleotídicas codificaban 5 sustituciones aminoacídicas diferentes, que son: V595I, S745L, M1328I, F1386S y A1422G (Tabla 8).

Tan solo las sustituciones V595I y F1386S fueron identificadas en aislados no sensibles a las equinocandinas, mientras que las mutaciones S745L, M1328I, y A1422G fueron detectadas exclusivamente en aislados sensibles a las 3 equinocandinas.

**Tabla 7.** Secuencia de aminoácidos *wild type* de las regiones HS1 y HS2 de Fks1p y Fks2p de las 3 especies del complejo *C. parapsilosis*.

| Especie                 | Fks1p                      |                              | Fks2p                      |                              |
|-------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|
|                         | HS1 (652-660) <sup>a</sup> | HS2 (1369-1376) <sup>a</sup> | HS1 (518-526) <sup>a</sup> | HS2 (1221-1228) <sup>a</sup> |
| <i>C. parapsilosis</i>  | FLTLSIRDA                  | DWIRRYTL                     | FLTLSMKDP                  | HWLQRCVV                     |
| <i>C. orthopsilosis</i> | FLTSLRDA                   | DWVRRYTL                     | FLTLSMRDP                  | HWLQRCVV                     |
| <i>C. metapsilosis</i>  | FLTSLRDA                   | DWIRRYTL                     | FLTSLRDA                   | DWIRRYTL                     |

<sup>a</sup> Posición aminoacídica de la Fks1p y Fks2p de *C. parapsilosis*

**Tabla 8.** Resultados del estudio de sensibilidad *in vitro* frente a las 3 equinocandinas de las cepas de *C. parapsilosis* no sensibles a alguna equinocandina, y de las cepas que presentaron mutación en Fks1p.

| Cepa                | CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) |     |       | Sustituciones aminoacídicas |                |
|---------------------|--------------------------|-----|-------|-----------------------------|----------------|
|                     | AFG                      | MFG | CFG   | Fks1p                       | Fks2p          |
| 1161LL              | 4                        | 4   | 1     | WT <sup>b</sup>             | WT             |
| 1031LL              | 1                        | 1   | 0.5   | S745S/L <sup>c</sup>        | WT             |
| 928LL               | 2                        | 2   | 4     | V595I <sup>c</sup>          | WT             |
| 831LL               | 1                        | 1   | 0.5   | S745L <sup>c</sup>          | WT             |
| 713LL               | 1                        | 1   | 0.25  | S745S/L <sup>c</sup>        | WT             |
| 681LL               | 1                        | 2   | 0.5   | A1422G <sup>c</sup>         | WT             |
| 544LL               | 1                        | 1   | 0.125 | S745S/L <sup>c</sup>        | - <sup>d</sup> |
| 474LL               | 1                        | 1   | 0.25  | M1328I <sup>c</sup>         | WT             |
| 462LL               | 2                        | 2   | 0.5   | S745S/L <sup>c</sup>        | WT             |
| ST-14 <sup>a</sup>  | 8                        | 4   | 1     | F1386F/S <sup>c</sup>       | WT             |
| RS-16 <sup>a</sup>  | 4                        | 8   | 2     | WT                          | WT             |
| CP-368 <sup>a</sup> | 4                        | 1   | 0.5   | WT                          | WT             |
| CP-372 <sup>a</sup> | 4                        | 4   | 2     | WT                          | WT             |
| AX-32 <sup>a</sup>  | 1                        | 1   | 0.5   | S745S/L <sup>c</sup>        | WT             |

<sup>a</sup> Cepas obtenidas de la colección del estudio de Candidemia Project

<sup>b</sup> WT: wild type

<sup>c</sup> Mutaciones identificadas fuera de la región HS1

<sup>d</sup> -: No testado

La sustitución S745L fue detectada en 6 aislados diferentes, 5 de los cuales presentaban la mutación nucleotídica en un único alelo y el otro en ambos alelos. Esta mutación nucleotídica conllevó un cambio de aminoácido no conservativo; el aminoácido WT (serina) es hidrófilo y la leucina es un aminoácido hidrófobo. La mutación conservativa y homocigótica M1328I fue detectada en dos cepas diferentes y la mutación A1422G fue identificada en un único aislado.

La mutación homocigótica V595I fue detectada en la única cepa no sensible a la caspofungina (CIM = 4  $\mu\text{g/ml}$ ). Esta mutación conlleva la sustitución de una valina por una isoleucina, la cual es muy poco probable que modifique las propiedades de la estructura de la enzima  $\beta$ -(1,3)-D-glucano sintetasa, ya que los dos aminoácidos son altamente hidrófobos.

La mutación nucleotídica F1386S, situada a 10 aminoácidos de la región HS2 (1369-1376), fue identificada en un único alelo (mutación heterocigótica) en una cepa resistente a la AFG (CIM = 8  $\mu\text{g/ml}$ ) e intermedia a la MFG (CIM = 4  $\mu\text{g/ml}$ ). Esta

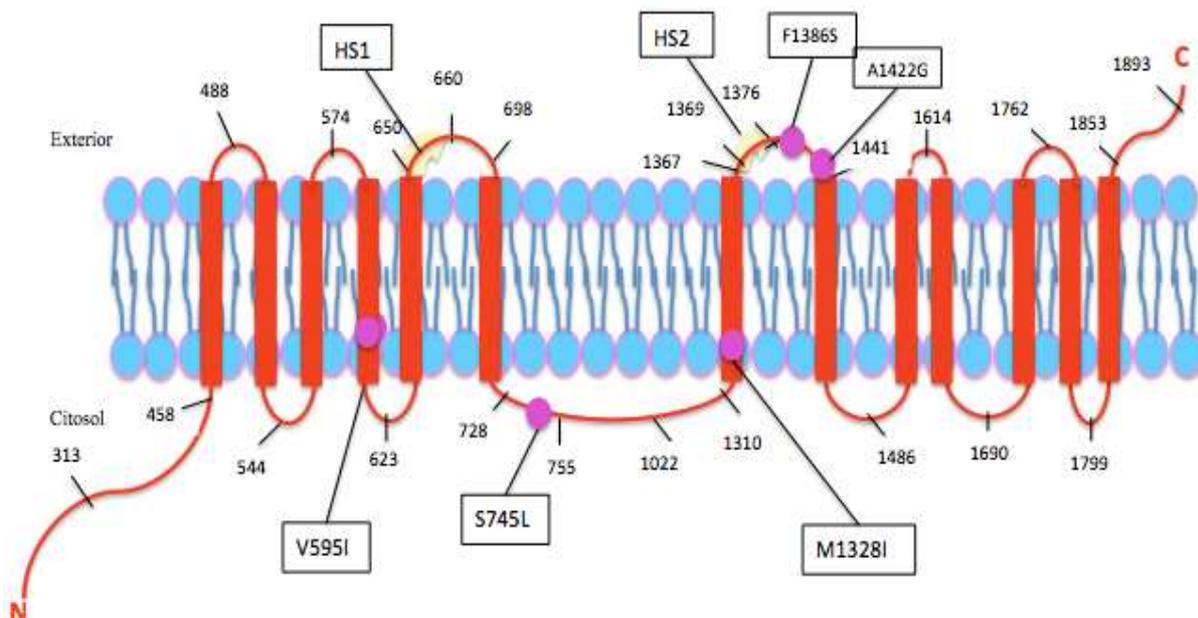
sustitución de la fenilalanina por una serina puede conferir cambios en las propiedades físicas de la estructura de la enzima  $\beta$ -(1,3)-D-glucano sintetasa, ya que la fenilalanina es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba mientras que la serina tiene una cadena lateral polar.

En la Tabla 9 se muestra un alineamiento de varios fragmentos de secuencias aminoacídicas de la Fks1p correspondientes a 7 especies diferentes de *Candida* y *S. cerevisiae*, y centrados en la zona en la que se han identificado los cambios aminoacídicos en los aislados de *C. parapsilosis* del estudio. Tal y como se puede observar, la sustitución aminoacídica F1386S queda localizada en un posición altamente conservada entre las 8 especies. De hecho, toda la secuencia aminoacídica que comprende las regiones HS1 y HS2 está altamente conservada entre las 8 especies, mostrando homologías de > 81 % entre los aminoácidos 623-1486. Esta elevada homología, permitió extrapolar a *C. parapsilosis* la topología de la glucano sintetasa de *S. cerevisiae* que ha sido descrita recientemente. En la Figura 9 se puede observar la extrapolación del modelo topográfico de la Fks1p de *S. cerevisiae* en *C. parapsilosis*, así como las respectivas mutaciones identificadas en este estudio, que están representadas con puntos lilas. De esta forma, se puede observar como la mutación F1386S queda situada en el exterior de la membrana, pudiendo así alterar el sitio de unión de las equinocandinas, por lo que se sugiere que esta mutación podría estar relacionada con la resistencia a las equinocandinas que presenta la cepa portadora de la misma.

**Tabla 9.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la Fks1p de 7 especies de *Candida* y de *Saccharomyces cerevisiae*.

| Mutaciones              | V595I |   |     | S745L |   |     | M1328I |   |      | F1386S |   |      | A1422G |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------------------|-------|---|-----|-------|---|-----|--------|---|------|--------|---|------|--------|---|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Organismo               | 592   | * | 598 | 742   | * | 748 | 1325   | * | 1331 | 1383   | * | 1389 | 1419   | * | 1425 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| <i>C. parapsilosis</i>  | F     | F | A   | V     | M | P   | L      | R | I    | Y      | S | K    | I      | L | Q    | V | F | M | L | V | L | F | I | S | F | I | P | L | V | F | V | A | Q | I | Y |
| <i>C. orthopsilosis</i> | F     | F | A   | V     | M | P   | L      | R | I    | Y      | S | K    | I      | L | Q    | V | F | M | L | V | L | F | I | S | F | I | P | L | V | F | V | A | Q | I | Y |
| <i>C. metapsilosis</i>  | F     | F | A   | V     | M | P   | L      | R | I    | Y      | S | K    | I      | L | Q    | V | F | M | L | V | L | F | I | S | F | I | P | L | V | F | V | A | Q | I | Y |
| <i>C. albicans</i>      | F     | F | A   | V     | M | P   | L      | R | I    | Y      | S | K    | I      | L | Q    | V | F | I | L | V | L | F | I | S | F | I | P | L | V | F | V | A | Q | I | Y |
| <i>C. glabrata</i>      | F     | F | S   | V     | M | P   | L      | R | I    | Y      | S | K    | I      | L | Q    | M | F | M | L | T | L | W | I | A | F | V | P | I | V | F | A | G | Q | I | Y |
| <i>C. tropicalis</i>    | -     | - | -   | -     | - | -   | -      | R | I    | Y      | S | K    | I      | L | Q    | V | F | I | L | V | L | F | I | S | F | I | P | L | V | F | V | A | Q | I | Y |
| <i>C. krusei</i>        | Y     | L | T   | V     | M | P   | L      | R | I    | Y      | S | K    | V      | L | Q    | M | F | M | L | T | L | F | I | S | F | V | P | L | V | F | V | A | Q | V | Y |
| <i>S. cerevisiae</i>    | F     | F | S   | I     | M | P   | L      | R | I    | Y      | S | K    | I      | L | Q    | M | F | M | L | T | L | W | I | A | F | V | P | I | V | F | A | G | Q | I | Y |

Se muestran los 3 aminoácidos anteriores y posteriores a la mutaciones identificadas en los aislados de *C. parapsilosis* : V595I, S745L, M1328I, F1386S y A1422G (marcadas con \*). Las posiciones aminoacídicas son las correspondientes a la Fks1p de *C. parapsilosis* . “-” indica un vacío en la secuencia proteica.



**Figura 9.** Modelo topográfico de Fks1p de *C. parapsilosis* con las respectivas mutaciones identificadas en este estudio, utilizando como plantilla el modelo topográfico de Fks1p de *S. cerevisiae* (151). Barras rojas indican regiones transmembrana, barras amarillas indican regiones HS y puntos lilas indican las mutaciones identificadas en los aislados analizados en este estudio.

En ninguno de los 21 aislados de *C. parapsilosis*, en los que se analizó las regiones HS1 y HS2 del gen *FKS2* se observó ninguna mutación, ni en las regiones HS ni fuera de éstas.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos del análisis del gen *FKS1* de los aislados de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

En el caso de *C. orthopsilosis*, tan sólo una de las cuatro cepas presentó una mutación heterocigótica fuera de la región HS1 del gen *FKS1* que codificó para la sustitución aminoacídica I105I/V. La región HS2, tan solo pudo ser analizada en 2 de los 4 aislados por falta de amplificación del producto de PCR. Ambos aislados presentaron la sustitución aminoacídica heterocigótica V758V/I ya descrita previamente (163).

Los 3 aislados de *C. metapsilosis* analizados presentaron la secuencia nucleotídica WT en la región HS1 del gen *FKS1* (Tabla 7), una sustitución aminoacídica en la región HS2, la sustitución heterocigótica I823I/V que ya se había

observado en *C. orthopsilosis* y una mutación heterocigótica, Y760Y/F, fuera de la región HS2 (Tabla 10).

Ninguna de las mutaciones identificadas en los aislados de *C. orthopsilosis* y de *C. metapsilosis* parecen estar relacionadas con la sensibilidad a las equinocandinas, ya que los 7 aislados estudiados fueron sensibles a los 3 antifúngicos.

**Tabla 10.** Resultados del estudio de sensibilidad *in vitro* frente a las 3 equinocandinas y del análisis de las regiones HS1 y HS2 de Fks1p en 4 aislados clínicos de *C. orthopsilosis* y en 3 de *C. metapsilosis*.

| Especie                 | Cepa                     | CIM (µg/ml) |      |      | Sustituciones aminoacídicas |                               |
|-------------------------|--------------------------|-------------|------|------|-----------------------------|-------------------------------|
|                         |                          | AFG         | MFG  | CFG  | HS1 Fks1p                   | HS2 Fks1p                     |
| <i>C. orthopsilosis</i> | 974LL <sup>a</sup>       | 1           | 1    | 0.25 | WT <sup>a</sup>             | ND <sup>b</sup>               |
|                         | 81/026 <sup>a</sup>      | 0,5         | 0,5  | 0,5  | WT                          | V758V/I                       |
|                         | 02-212 <sup>a</sup>      | 0,5         | 0,25 | 0,25 | I105I/V <sup>c</sup>        | ND                            |
|                         | AM2005/0300 <sup>a</sup> | 0,25        | 0,25 | 0,25 | WT                          | V758V/I                       |
| <i>C. metapsilosis</i>  | J960161 <sup>b</sup>     | 0,5         | 0,5  | 0,5  | WT                          | I823I/V; Y760Y/F <sup>c</sup> |
|                         | AM2005/0301 <sup>b</sup> | 0,25        | 0,5  | 0,25 | WT                          | I823I/V; Y760Y/F <sup>c</sup> |
|                         | AM2005/0299 <sup>b</sup> | 0,125       | 0,5  | 0,25 | WT                          | I823I/V; Y760Y/F <sup>c</sup> |

<sup>a</sup> WT: wild type

<sup>b</sup> ND: no determinado

<sup>c</sup> Mutaciones identificadas fuera de las regiones HS

#### 4.3.2. Otras especies del género *Candida* incluidas en el estudio

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos del estudio de sensibilidad frente a las 3 equinocandinas, así como los resultados obtenidos del análisis de las regiones HS1 y HS2 de los genes *FKS1* y *FKS2*, para los aislados de *Candida* diferentes a *C. parapsilosis complex*, incluidos en este estudio por presentar resistencia a alguna de las equinocandinas. La secuencia de aminoácidos WT de las regiones HS de los genes *FKS1* y *FKS2* de las especies de *Candida* estudiadas así como su posición, se pueden ver en la Tabla 12.

De las 28 cepas de *Candida* no sensibles a alguna de las 3 equinocandinas, tan solo 7 aislados presentaron alguna mutación en las regiones HS de los genes *FKS1* o *FKS2* (25%).

Seis de los 12 aislados de *C. glabrata* (50%) presentaron alguna mutación en las regiones HS, cinco en el gen *FKS2* y uno en el gen *FKS1*. Uno de los aislados

resistentes a la CFG (CIM = 0,5 µg/ml) presentó la mutación D666E en la región HS1 del gen *FKS2*. Otros dos aislados presentaron la mutación S663P en la región HS1 del gen *FKS2* y fueron los que mostraron unas CIM más elevadas para la AFG (CIM = 2 µg/ml) y la MFG (CIM = 4, 1 µg/ml). Un cuarto aislado, definido como resistente a la CFG (CIM = 0,5 µg/ml) e intermedio a la AFG (CIM = 0,25 µg/ml), presentó una mutación en la región HS1 del gen *FKS1* con la sustitución aminoacídica S629P. Las otras dos cepas, intermedias a la AFG (CIM = 0,25 µg/ml) y resistentes a la CFG (CIM = 1 µg/ml), presentaron la mutación en la misma posición de la región HS1 del gen *FKS2*, pero el aminoácido sustituido fue diferente: F695S y F695C, ésta última mutación no había sido identificada con anterioridad.

En el caso de los 7 aislados de *C. krusei* no sensibles a las equinocandinas, tan solo un aislado resistente a la CFG (CIM = 4 µg/ml) e intermedio a la MFG (CIM = 1 µg/ml) presentó una mutación en la región HS2 del gen *FKS1*, la mutación R1368G. No obstante, todos los aislados resistentes de *C. krusei* estudiados presentaron la sustitución aminoacídica L701M situada fuera de la región HS1 (655-663) del gen *FKS1*. Sustitución aminoacídica que también pudo demostrarse en 6 aislados de *C. krusei* epidemiológicamente no relacionados y sensibles a las 3 equinocandinas. Por lo que podría deducirse que la mutación L701M en *C. krusei* no está implicada en la sensibilidad reducida a las equinocandinas.

Finalmente, ninguno de los 5 aislados de *C. albicans* y de los 4 aislados de *C. tropicalis* presentó ninguna mutación en el gen *FKS1* y no se estudio el gen *FKS2*.

**Tabla 11.** Resumen de los resultados obtenidos en el estudio de sensibilidad y descripción de las mutaciones detectadas en Fks1p y Fks2p de las cepas de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. albicans* y *C. tropicalis* incluidas en el estudio.

| Especie              | Aislado | CIM (µg/ml) |        |      | Fks1p              |        | Fks2p          |     |
|----------------------|---------|-------------|--------|------|--------------------|--------|----------------|-----|
|                      |         | AFG         | MFG    | CFG  | HS1                | HS2    | HS1            | HS2 |
| <i>C. glabrata</i>   | 912LL   | 0,125       | 0,016  | 0,5  | WT <sup>a</sup>    | WT     | D666E          | WT  |
|                      | 913LL   | 0.06        | <0.008 | 0.25 | WT                 | WT     | WT             | WT  |
|                      | 982LL   | 0,03        | <0,008 | 2    | WT                 | WT     | WT             | WT  |
|                      | 1119LL  | 0,06        | <0,008 | 0.25 | WT                 | WT     | WT             | WT  |
|                      | B1113   | 0,125       | 0,016  | 0,5  | WT                 | WT     | WT             | WT  |
|                      | M1105   | 2           | 4      | 8    | WT                 | WT     | S663P          | WT  |
|                      | CS-52   | 1           | 1      | 1    | WT                 | WT     | WT             | WT  |
|                      | 1176LL  | 0,25        | 0,06   | 0,5  | S629P              | WT     | WT             | WT  |
|                      | CG-31   | 0,125       | 0,016  | 1    | WT                 | WT     | WT             | WT  |
|                      | CG-65   | 0,25        | 0,016  | 1    | WT                 | WT     | F659S          | WT  |
|                      | CG-68   | 2           | 1      | 0,12 | WT                 | WT     | S663P          | WT  |
| CG-74                | 0,25    | 0,016       | 1      | WT   | WT                 | F659C  | WT             |     |
| <i>C. krusei</i>     | 966LL   | 0,03        | 0,06   | 0,5  | L701M <sup>b</sup> | WT     | - <sup>c</sup> | -   |
|                      | CY-118  | 0.5         | 1      | 4    | L701M <sup>b</sup> | R1368G | -              | -   |
|                      | CK-8    | 0,03        | 0,25   | 2    | L701M <sup>b</sup> | WT     | -              | -   |
|                      | CK-45   | 0,12        | 2      | 1    | L701M <sup>b</sup> | WT     | -              | -   |
|                      | EU-123  | 0,12        | 0,12   | 2    | L701M <sup>b</sup> | WT     | -              | -   |
|                      | EU-220  | 0,12        | 0,25   | 2    | L701M <sup>b</sup> | WT     | -              | -   |
|                      | GIMI-75 | 0,125       | 0,125  | 2    | L701M <sup>b</sup> | WT     | -              | -   |
| <i>C. albicans</i>   | 894LL   | 0,016       | <0,008 | 0,5  | WT                 | WT     | -              | -   |
|                      | 896LL   | 0,03        | 0,016  | 0,5  | WT                 | WT     | -              | -   |
|                      | CA-19   | 0,016       | 0,016  | 1    | WT                 | WT     | -              | -   |
|                      | CA-253  | 0,03        | 0,016  | 1    | WT                 | WT     | -              | -   |
|                      | CA-429  | 0,016       | 0,016  | 1    | WT                 | WT     | -              | -   |
| <i>C. tropicalis</i> | RS-14   | 8           | 8      | 0.25 | WT                 | WT     | -              | -   |
|                      | CAT-60  | 0,016       | 0,016  | 1    | WT                 | WT     | -              | -   |
|                      | CAT-64  | 2           | 0,016  | 0,03 | WT                 | WT     | -              | -   |
|                      | CAT-76  | 0.016       | 0.12   | 1    | WT                 | WT     | -              | -   |

<sup>a</sup> Secuencia Wild Type.

<sup>b</sup> Mutaciones situadas fuera de las regiones HS.

<sup>c</sup> -: No determinado.

Casillas rojas indican CIM interpretadas como R, casillas amarillas indica CIM interpretadas como I..

**Tabla 12.** Secuencia de aminoácidos *wild type* de las regiones HS1 y HS2 de Fks1p y Fks2p de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. albicans* y *C. tropicalis*.

| Especie              | Fks1p             |                     | Fks2p             |                      |
|----------------------|-------------------|---------------------|-------------------|----------------------|
|                      | HS1               | HS2                 | HS1               | HS2                  |
| <i>C. glabrata</i>   | 625-FLILSIRDP-633 | 1340-DWVRRYTL-1347  | 659-FLILSLRDP-667 | 1374-DWIRRYTL-1381   |
| <i>C. Krusei</i>     | 655-FLILSIRDP-663 | 1364-DWIRRYTL-1371  | - <sup>a</sup>    | -                    |
| <i>C. albicans</i>   | 641-FLTLSLRDP-649 | 1357-DWIRRYTL- 1364 | 430-FLTLSLRDP-438 | 1133-HWLQRCIF-1140   |
| <i>C. tropicalis</i> | 76-FLTLSLRDP-84   | 792-DWIRRYTL-799    | 430-FLTLRDP-438   | 1133- HWLQRCIF -1140 |

<sup>a</sup> -: secuencia no publicada en el GenBank

#### **4.4. Resistencia a las equinocandinas en *C. parapsilosis complex* por respuestas adaptativas al estrés: implicación de los niveles basales de quitina en la reducida sensibilidad a las equinocandinas y su modificación por la acción de la caspofungina**

##### **4.4.1. Comparación de los niveles basales de quitina en las especies del complejo *C. parapsilosis***

Para detectar diferencias en los niveles basales de quitina entre las 3 especies del complejo *C. parapsilosis* y entre cepas sensibles y no sensibles a las equinocandinas se analizaron un total de 19 aislados: 5 de *C. parapsilosis* sensibles a las 3 equinocandinas, 6 de *C. parapsilosis* no sensibles, 4 de *C. orthopsilosis*, 3 de *C. metapsilosis* y la cepa control SC5314 de *C. albicans*.

En la Tabla 13 se muestran los porcentajes de glucosamina (monómero de la quitina), glucosa (monómero del glucano) y manosa (monómero del manano) presentes en la pared celular de cada uno de los aislados estudiados, referidos al total de carbohidratos detectados en cada cepa.

No se detectaron diferencias significativas en los niveles de quitina presentes en la pared celular entre las 3 especies que componen el complejo ( $p=0,56$ ). Sin embargo, *C. metapsilosis* fue la especie que presentó de media unos niveles más elevados de quitina, seguida de *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis* (figura 10).

Los aislados de *C. metapsilosis* presentaron un porcentaje medio de quitina del 9,53% con respecto al total de carbohidratos detectados. Los valores se situaron entre el 9,07% y el 10,34%.

En el caso de los aislados de *C. orthopsilosis*, el porcentaje medio de quitina se situó en el 9,42%, siendo el valor más bajo un 6,68% y el más elevado un 14,26%.

Con respecto a *C. parapsilosis* se pudieron observar diferencias notables en los niveles basales de quitina entre las diferentes cepas estudiadas. Los aislados de *C. parapsilosis* presentaron en general porcentajes de quitina más bajos que los descritos para las otras dos especies del complejo, siendo el porcentaje medio de los 11 aislados un 7,96%, dónde el valor más bajo fue del 5,01% y el más alto del 11,17%.

Cuando se estratificó en función de la sensibilidad a las equinocandinas, los aislados sensibles presentaron un porcentaje medio de quitina del 7,79%, siendo en el grupo de aislados no sensibles del 8,14% ( $p=0,993$ ).

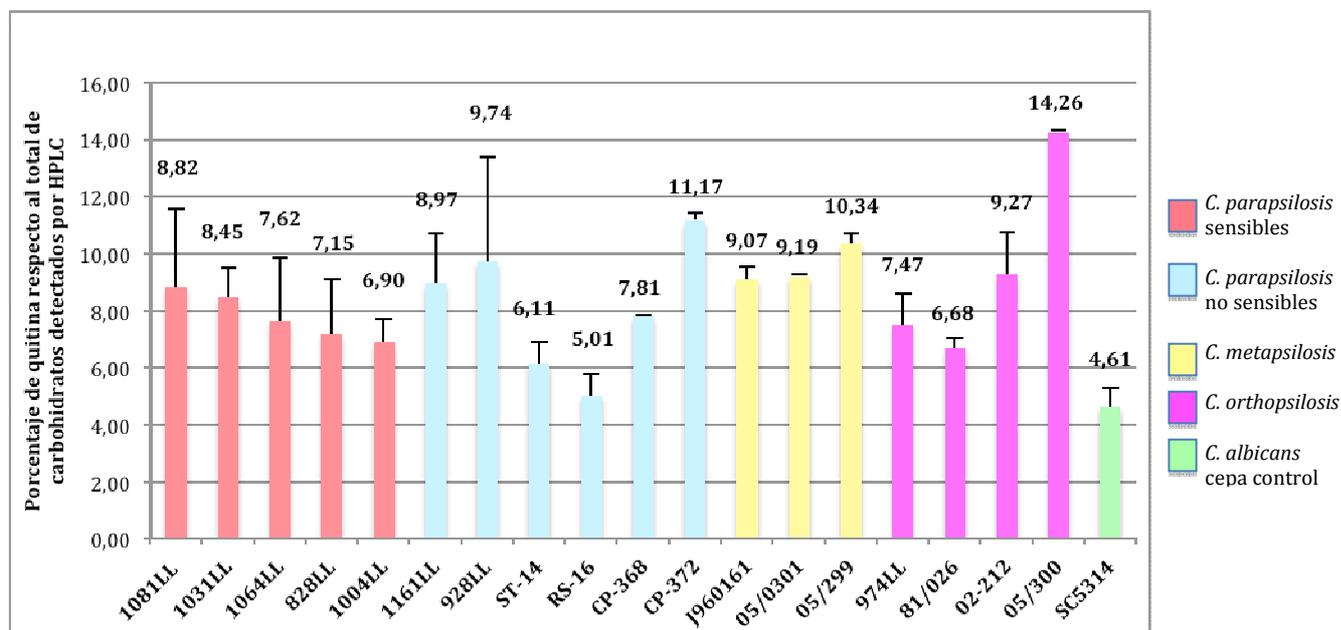
De entre los 18 aislados de *C. parapsilosis complex* estudiados, las dos cepas que presentaron los niveles más bajos de quitina fueron las que presentaron una mayor resistencia a las equinocandinas. Una de ellas, con unas CIM de 8 y 4  $\mu\text{g/ml}$  para la AFG y la MFG y una mutación heterocigótica en la región HS2 de la Fks1p (F1386S), presentó un porcentaje de quitina del 6,11% y la otra, con unas CIM de 4 y 8  $\mu\text{g/ml}$  para la AFG y MFG, respectivamente, mostró un porcentaje de quitina del 5,01%.

No se detectaron diferencias en el contenido basal de quitina presente en la pared celular de las 5 cepas sensibles a las equinocandinas incluidas en el estudio, ni tan solo entre las cepas WT y las 2 cepas que presentaron una mutación en el gen *FKSI* (sustitución aminoacídica S745L y M1328I)

Como ya se ha comentado, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las 3 especies que componen el complejo *C. parapsilosis*. No obstante, cuando se comparó el porcentaje medio de quitina presente en la pared celular de cada una de las especies del complejo con el porcentaje obtenido de la cepa control SC5314 de *C. albicans*, el porcentaje de quitina presente en la pared celular de *C. albicans* (4,61%) estuvo muy por debajo de los porcentajes obtenidos en las 3 especies del complejo que, a excepción de los dos aislados resistentes ya comentados, presentaron diferencias que fueron estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ).

**Tabla 13.** Resultados obtenidos del estudio del contenido basal de carbohidratos presentes en la pared celular, así como del estudio de sensibilidad *in vitro* de las cepas de *C. parapsilosis complex* incluidas en este estudio y de la cepa control.

| Especie  | Cepa    | Análisis de sensibilidad (µg/ml) |       |       | % Carbohidratos |         |        |
|--|---------|----------------------------------|-------|-------|-----------------|---------|--------|
|  |         | AFG                              | MFG   | CFG   | Glucosamina     | Glucosa | Manosa |
| <i>C. parapsilosis</i> sensibles a las equinocandinas    | 1081LL  | 0,5                              | 0,25  | 0,125 | 8,82            | 77,46   | 13,72  |
|  | 1031LL  | 1                                | 1     | 0,5   | 8,45            | 78,48   | 13,07  |
|  | 1064LL  | 1                                | 2     | 1     | 7,62            | 77,88   | 14,49  |
|  | 828LL   | 2                                | 1     | 0,5   | 7,15            | 76,93   | 15,92  |
|  | 1004LL  | 2                                | 2     | 1     | 6,90            | 78,76   | 14,34  |
| <i>C. parapsilosis</i> no sensibles a las equinocandinas | 1161LL  | 4                                | 4     | 1     | 8,97            | 76,50   | 14,53  |
|  | 928LL   | 2                                | 2     | 4     | 9,74            | 74,40   | 15,87  |
|  | ST-14   | 8                                | 4     | 1     | 6,11            | 79,11   | 14,78  |
|  | RS-16   | 4                                | 8     | 2     | 5,01            | 82,84   | 12,15  |
|  | CP-368  | 4                                | 1     | 0,5   | 7,81            | 81,64   | 10,54  |
|  | CP-372  | 4                                | 4     | 2     | 11,17           | 71,44   | 17,40  |
| <i>C. metapsilosis</i>                                   | J960161 | 0,5                              | 0,5   | 0,5   | 9,07            | 70,71   | 20,22  |
|  | 05/0301 | 0,25                             | 0,5   | 0,25  | 9,19            | 71,37   | 19,44  |
|  | 05/299  | 0,125                            | 0,5   | 0,25  | 10,34           | 70,31   | 19,34  |
| <i>C. orthopsilosis</i>                                  | 974LL   | 1                                | 1     | 0,25  | 7,47            | 75,36   | 17,18  |
|  | 81/026  | 0,5                              | 0,5   | 0,5   | 6,68            | 82,53   | 10,80  |
|  | 02-212  | 0,5                              | 0,25  | 0,25  | 9,27            | 76,73   | 14,01  |
|  | 05/300  | 0,25                             | 0,25  | 0,25  | 14,26           | 68,92   | 16,82  |
| Cepa control <i>C. albicans</i>                          | SC5314  | <0,016                           | 0,016 | 0,06  | 4,61            | 77,56   | 17,83  |



**Figura 10.** Porcentaje de quitina basal presente en la pared celular de los 18 aislados de *C. parapsilosis complex* analizados y la cepa control.

#### 4.4.2. Efecto de la caspofungina sobre el contenido de quitina basal presente en la pared celular

Para determinar el efecto que tiene la caspofungina sobre el contenido de quitina presente en la pared celular en las 3 especies del complejo *C. parapsilosis* se estudiaron 8 aislados diferentes: 2 aislados de *C. parapsilosis* sensibles a las 3 equinocandinas, uno de los cuales presentaba una mutación en el gen *FKSI* (S745L); 4 aislados *C. parapsilosis* no sensibles, dos de los cuales presentaron una mutación en el gen *FKSI* (F1386S y V595I); un aislado de *C. metapsilosis* y un aislado de *C. orthopsilosis*. Además se incluyó la cepa control SC5314 de *C. albicans*.

En la Figura 11 se pueden observar los porcentajes de glucosamina con respecto al total de carbohidratos detectados, de forma basal (sin tratamiento) y después del tratamiento con caspofungina a una concentración de 0,032 µg/ml.

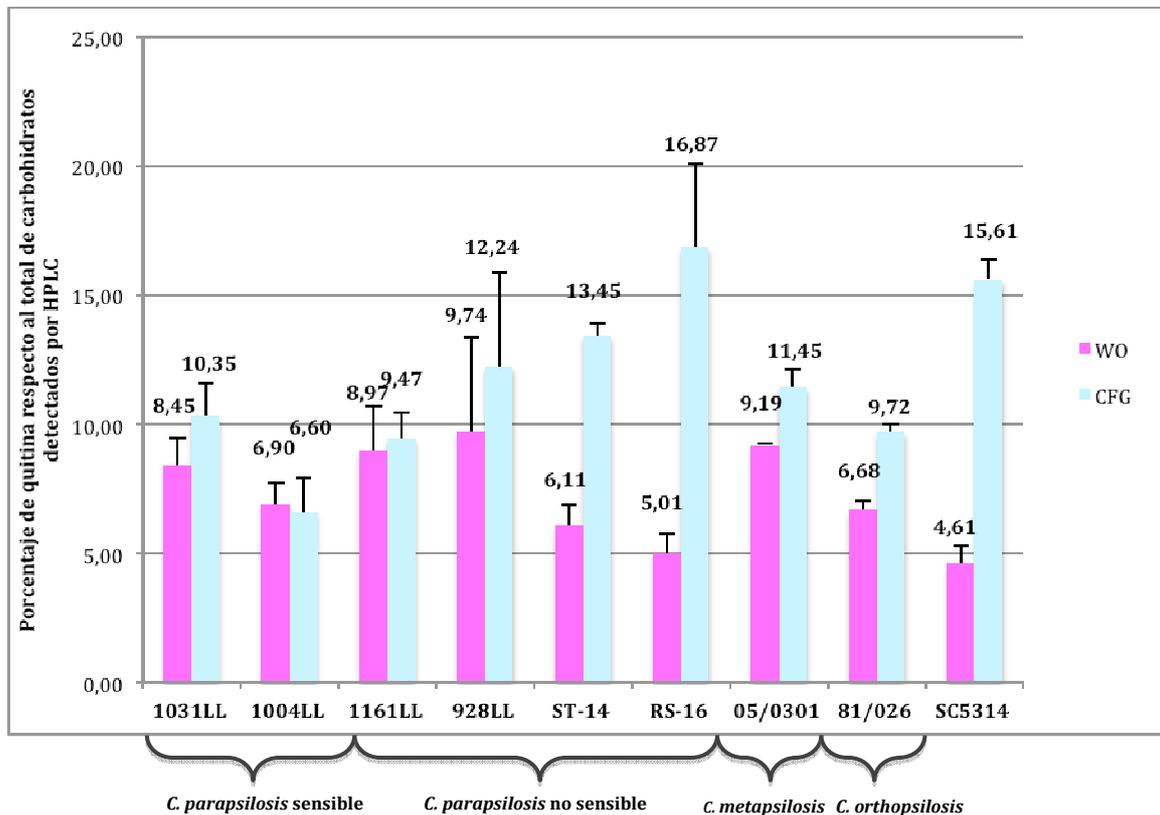
Tal y como se puede observar en Figura 11, 7 de los 8 aislados incluidos en este estudio incrementaron el contenido basal de quitina de la pared celular como respuesta a la inhibición de la síntesis del β-glucano causado por la CFG (Figura 12) ( $p < 0,05$ ).

Tres de los 4 aislados sensibles a las equinocandinas, incrementaron ligeramente el contenido basal de quitina presente en la pared celular: *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* presentaron un incremento del 3,04% y del 2,26%, respectivamente, y un aislado de *C. parapsilosis* del 1,90%. Mientras que una cuarta cepa sensible a las 3 equinocandinas, mostró una disminución del contenido de quitina del 0,3% después de ser expuesta al tratamiento con CFG.

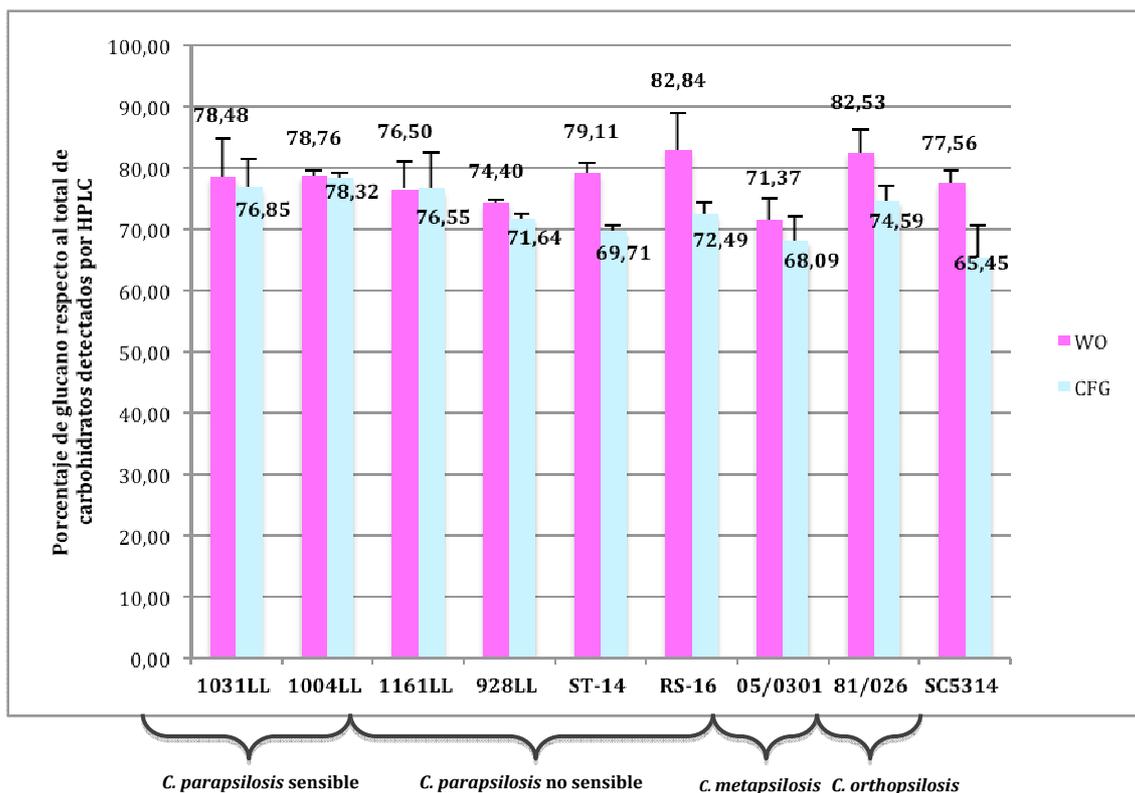
Con respecto a los aislados de *C. parapsilosis* no sensibles a las equinocandinas, se detectó mucha variabilidad en el incremento del contenido de quitina después del tratamiento con CFG (entre el 0,5% y el 11,86%). Los aislados que presentaron un mayor incremento en los niveles de quitina después del tratamiento con CFG fueron las dos cepas que presentaron una resistencia más elevada a las equinocandinas y que a su vez habían mostrado los niveles basales de quitina más bajos. Así, la cepa que presentó unas CIM de 4 y 8 µg/ml para la AFG y la MFG, respectivamente, presentó un

incremento del contenido de quitina del 11,86%. La cepa con la mutación heterocigótica F1386S y unas CIM de 8 y 4 µg/ml para la AFG y la MFG, respectivamente, incrementó su contenido basal de quitina en un 7,34%. Los otros dos aislados no sensibles a las equinocandinas también presentaron un ligero incremento de su contenido basal de quitina, aunque no fue tan pronunciado como el de los otros dos aislados.

En el caso de la cepa control SC5314 de *C. albicans*, la cual presentó el nivel basal de quitina más bajo de entre todos los aislados estudiados, presentó un incremento del nivel de quitina del 11%.



**Figura 11.** Porcentaje de quitina basal (barras lilas) y después de un tratamiento con caspofungina (barras azules) respecto al total de carbohidratos detectados mediante HPLC de las cepas de *C. parapsilosis complex* y la cepa control.



**Figura 12.** Porcentaje de glucano basal (barras lilas) y después de un tratamiento con caspofungina (barras azules) respecto al total de carbohidratos detectados mediante HPLC de las cepas de *C. parapsilosis complex* y la cepa control.

#### 4.4.3. Análisis de la distribución de la quitina en la pared celular antes y después del tratamiento con caspofungina

Se analizó la distribución de la quitina presente en la pared celular en ausencia de tratamiento y después de un tratamiento con CFG (0,032  $\mu\text{g/ml}$ ) en las 8 cepas del complejo *C. parapsilosis* incluidas en el estudio anterior y en la cepa control SC5314 de *C. albicans*.

En ausencia de tratamiento, en los 6 aislados estudiados de *C. parapsilosis* (Figura 13A y Figura 13B), en el aislado de *C. orthopsilosis* (Figura 13C) y en el aislado de *C. metapsilosis* (Figura 13D), la quitina situada en la capa interna de la pared celular (marcada con CFW; azul) estaba distribuida de forma uniforme alrededor de ésta. Por el contrario, la quitina situada al exterior de la pared celular (marcada con WGA-FITC; verde), tan sólo se observó en los polos de la célula, principalmente en las cicatrices de los brotes. En ningún caso se observó una mayor intensidad de

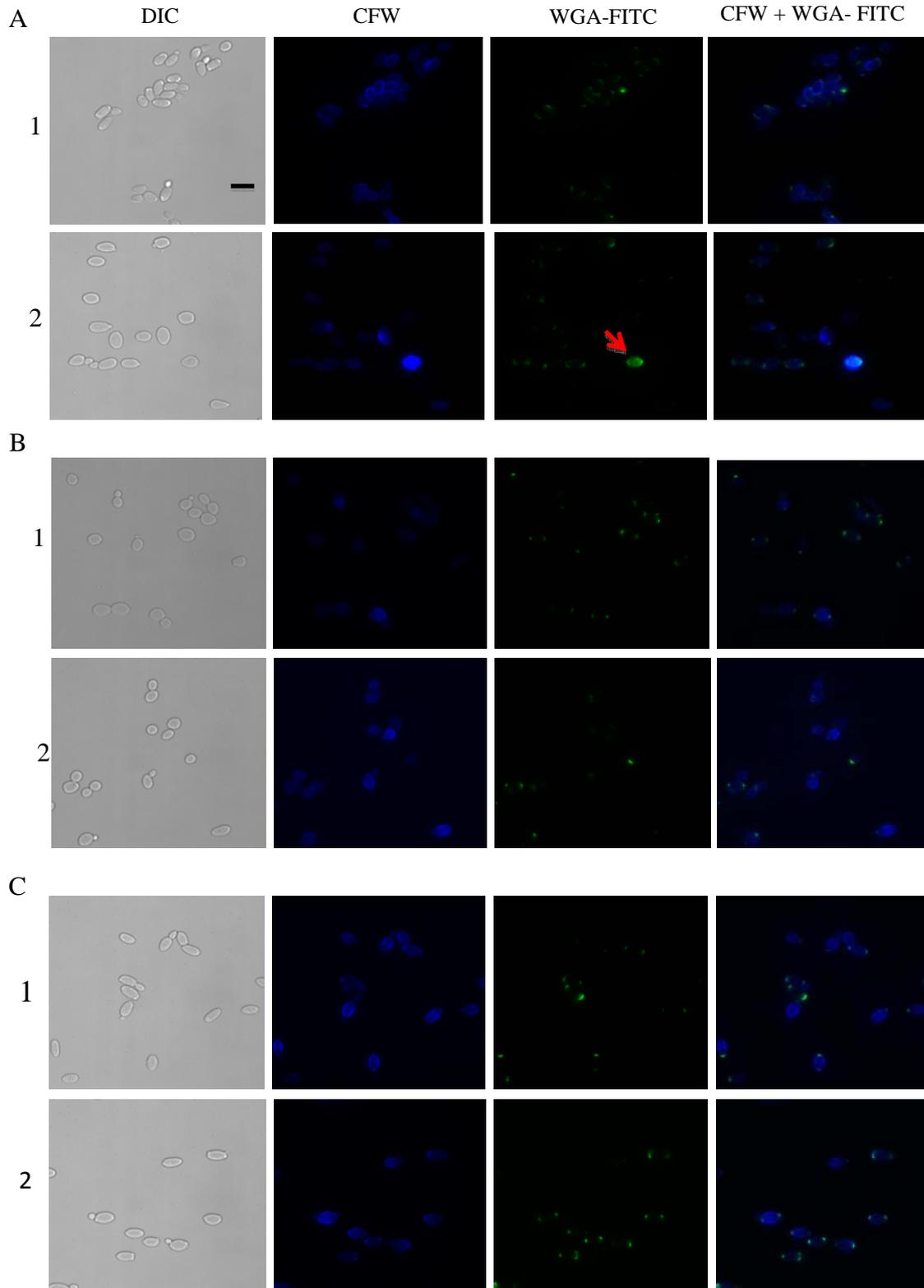
fluorescencia, con ninguno de los dos marcajes, en las regiones septales de las células que estaban en división.

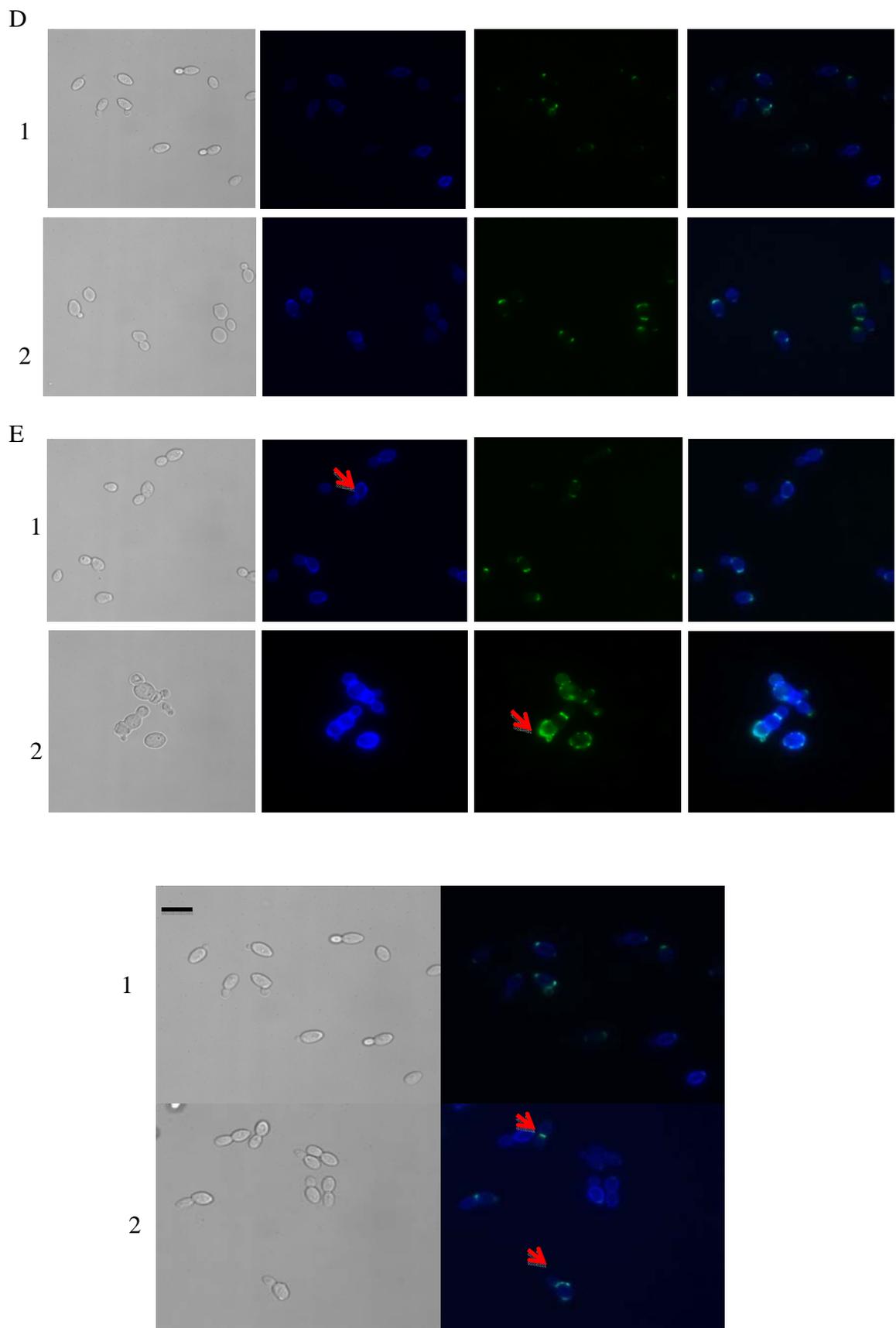
La distribución de la quitina en las cepas analizadas después del tratamiento con CFG fue, en general, la misma que la de las células sin tratar, aunque en algunos casos se pudo detectar un incremento en la fluorescencia emitida por ambos marcajes, como es el caso de la cepa RS-16 (Figura 13B), o una ligera disminución, como es el caso de la cepa 1004LL en la que se evidenció una reducción de glucosamina por HPLC (Figura 13A). En determinadas células se detectó un incremento en la fluorescencia de ambos fluorocromos (Figura 13A), en algún caso se observó un incremento particularmente notable tan sólo de la quitina expuesta al exterior de la célula (Figura 13C) y en el caso de cepa de *C. metapsilosis* un ligero incremento de la quitina situada dentro de la pared celular (Figura 13D).

En determinadas cepas, se pudo observar que después del tratamiento con CFG, las regiones septales presentaban un incremento en la intensidad de la fluorescencia emitida por ambos fluorocromos (Figura 14).

En el caso de la cepa control SC5314 de *C. albicans* (Figura 13E), en ausencia de tratamiento, la quitina situada en el interior de la pared celular estaba distribuida de forma uniforme alrededor de la pared celular. No obstante, y a diferencia de las cepas de *C. parapsilosis complex*, se observó una mayor intensidad en las regiones septales de las células en división, aun en ausencia de tratamiento. La quitina expuesta al exterior de las células presentó una distribución igual a la de *C. parapsilosis complex*, especialmente en los polos, aunque después del tratamiento con CFG las células presentaron una alteración de su morfología celular y un incremento notable de la fluorescencia emitida por ambos fluorocromos, indicando un incremento tanto de la quitina situada en el interior de la pared celular como de la quitina expuesta al exterior.

**Figura 13.** Distribución de la quitina sobre la pared celular en aislados de *C. parapsilosis complex* y la cepa control de *C. albicans*. Imágenes tomadas en microscopía CID y en fluorescencia con CFW y/o WGA. Las cepas fueron crecidas en YPD solo (1) o tratadas con CFG a una concentración de 0,032 µg/ml. (2). Cepa 1004LL de *C. parapsilosis* sensible a las equinocandinas (A), Cepa RS-16 de *C. parapsilosis* no sensible a la AFG (CIM=4) y a la MFG (CIM=8) (B), cepa 81/026 de *C. orthopsilosis* (C), cepa AM2005/301 de *C. metapsilosis* (D), cepa control SC5314 de *C. albicans* (E). Barra, 2 µm.





**Figura 14.** Distribución de la quitina sobre la pared celular de la cepa AM2005/0301 de *C. metapsilosis*. Imágenes tomadas en microscopía CID y en fluorescencia con CFW y WGA. La cepa fue crecidas en YPD solo (1) o tratada con CFG a una concentración de 0,032  $\mu\text{g/ml}$ . Barra, 2  $\mu\text{m}$ .

#### **4.5. Estudio de clonalidad de aislados de *C. parapsilosis*: búsqueda de genotipos endémicos a lo largo de un periodo de 15 años**

Se tipificaron mediante el uso de microsatélites un total de 25 aislados clínicos y la cepa control ATCC 22019.

Seis de los 25 aislados fueron estudiados debido a que presentaron exactamente la misma mutación en la región HS1 del gen *FKSI* (S745I), 5 de éstos fueron aislados en el Hospital de Sant Pau de Barcelona, con una diferencia de 12 años entre el primero y el último. El otro aislado fue obtenido del estudio FUNGEMYCA. Otros dos de los aislados incluidos en el estudio, también presentaron la misma mutación en la región HS2 del gen *FKSI* (M1328I). Además se incluyeron: 14 aislados que presentaban alguna relación espacial y/o temporal (3 de los cuales eran los que presentaron la mutación S745I), 4 cepas externas obtenidas del estudio FUNGEMYCA o aisladas en el Hospital la FE de Valencia y 2 cepas no sensibles a las equinocandinas aisladas en nuestro hospital.

Del total de 26 aislados de *C. parapsilosis* analizados se identificaron 24 genotipos diferentes (Tabla 14). El poder discriminatorio (PD) de cada uno de los *loci* por separado y de los 4 *loci* en conjunto fue calculado mediante el Índice de Diversidad de Simpson. El *locus* que presentó un mayor PD fue el CP6 (20 alelos; 20 genotipos) con un valor de 0,95, seguido de los *loci* CP4 (14 alelos; 14 genotipos) y B (9 alelos; 11 genotipos), ambos con un PD de 0,89, y el que presentó un menor PD fue el CP1 (8 alelos; 9 genotipos) con un valor del 0,81. El PD de la técnica, combinando los 4 *loci*, fue del 0,99.

En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos de la tipificación de los 26 aislados estudiados, así como información adicional de las muestras incluidas como son la fecha de aislamiento de la cepa, y la sala en donde se encontraba ingresado el paciente en el momento en que se aisló la cepa.

Solo se demostró una relación de clonalidad en tres aislados los cuales mostraron exactamente los mismos alelos para los 4 *loci* (Genotipo HSP-13), y que a su

vez presentaban la misma mutación S745L en la región HS1 del gen *FKSI* (544LL, 713LL y 831LL). Estos aislados procedían de hemocultivos obtenidos los años 2000, 2003 y 2005, identificándose así una cepa clonal que permaneció en nuestro hospital como mínimo durante 6 años. Otra cepa, la 462LL, aislada en el año 1998, presentó dos alelos diferentes con respecto a la cepa clonal, uno del CP6 y otro del B, siendo las diferencias en la longitud de los fragmentos cambios menores. Otro aislado, el 1031LL, mostró 7 de los 8 alelos iguales a la cepa clonal identificada, siendo tan solo 1 de los alelos del *locus* CP1 diferente. Estos dos aislados, podrían ser considerados microvariantes de la cepa clonal ya que las diferencias en la longitud de los fragmentos son consideradas cambios menores, y podrían ser atribuibles a la microevolución y además, presentan la misma mutación en el gen *FKSI*.

Todos los otros aislados incluidos en el estudio, por presentar una relación espacio/tiempo o por mostrar la misma mutación en el gen *FKSI*, presentaron diferentes alelos para los 4 *loci* estudiados, por lo que fueron considerados aislados clonalmente no relacionados.

**Tabla 14.** Resultados del análisis de tipificación de 26 aislados de *C. parapsilosis*.

| Cepa      | Edad paciente | Fecha aislamiento | Sala de origen        | Justificación Estudio                             | Locus (pb) |     |     |     |     |     |     |     | Genotipo |
|-----------|---------------|-------------------|-----------------------|---|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------|
|           |               |                   |                       |   | CP1        | CP4 | CP6 | B   |     |     |     |     |          |
| 547LL     | 38            | 15/08/00          | 31                    | <b>Relación espacio / tiempo</b>                  | 243        | 243 | 371 | 371 | 303 | 303 | 127 | 127 | HSP-1    |
| 544LL*    | 43            | 04/08/00          | 31                    |   | 237        | 243 | 305 | 305 | 262 | 262 | 133 | 133 | HSP-13   |
| 703LL     | 2             | 14/05/03          | 171                   |   | 240        | 240 | 321 | 321 | 251 | 265 | 145 | 145 | HSP-2    |
| 713LL*    | 1             | 24/06/03          | 172                   |   | 237        | 243 | 305 | 305 | 262 | 262 | 133 | 133 | HSP-13   |
| 728LL     | 0             | 13/11/03          | 173                   |   | 240        | 240 | 371 | 389 | 282 | 282 | 129 | 129 | HSP-3    |
| 1005LL    | 0             | 11/10/09          | Urgencias pediátricas |   | 240        | 243 | 377 | 377 | 312 | 312 | 129 | 129 | HSP-4    |
| 1004LL    | 68            | 04/10/09          | Edificio C planta 1H  |   | 243        | 243 | 324 | 383 | 286 | 286 | 129 | 129 | HSP-5    |
| 1002LL    | 0             | 27/09/09          | Neonatología          |   | 243        | 243 | 371 | 371 | 303 | 303 | 129 | 129 | HSP-6    |
| 1033LL    | 1             | 22/04/10          | Neonatología          |   | 243        | 243 | 368 | 318 | 268 | 294 | 129 | 129 | HSP-7    |
| 1031LL*   | 53            | 13/04/10          | Edificio C planta 1H  |   | 237        | 237 | 305 | 305 | 262 | 262 | 133 | 133 | HSP-14   |
| 1115LL    | 66            | 19/06/11          | Edificio C planta 1H  |   | 240        | 240 | 368 | 368 | 211 | 211 | 129 | 129 | HSP-8    |
| 1114LL    | 8             | 17/06/11          | Edificio E planta 2H  |   | 240        | 240 | 353 | 353 | 271 | 271 | 104 | 104 | HSP-9    |
| 1156LL    | 1             | 07/01/12          | Edificio E planta 2H  |   | 240        | 240 | 398 | 398 | 268 | 300 | 127 | 139 | HSP-10   |
| 1155LL    | 3             | 06/01/12          | Edificio E planta 2H  |   | 223        | 243 | 368 | 398 | 268 | 297 | 129 | 139 | HSP-11   |
| 462LL     | 0             | 09/09/98          | 245                   | <b>Mutación S745L Fks1p</b>                       | 237        | 243 | 305 | 305 | 262 | 280 | 133 | 127 | HSP-12   |
| 544LL*    | 43            | 04/08/00          | 31                    |   | 237        | 243 | 305 | 305 | 262 | 262 | 133 | 133 | HSP-13   |
| 713LL*    | 1             | 24/06/03          | 172                   |   | 237        | 243 | 305 | 305 | 262 | 262 | 133 | 133 | HSP-13   |
| 831LL     | 0             | 12/06/05          | 871                   |   | 237        | 243 | 305 | 305 | 262 | 262 | 133 | 133 | HSP-13   |
| 1031LL*   | 53            | 13/04/10          | Edificio C planta 1H  |   | 237        | 237 | 305 | 305 | 262 | 262 | 133 | 133 | HSP-14   |
| AX-32     | -             | -                 | Valencia              |   | 237        | 243 | 305 | 305 | 262 | 271 | 133 | 133 | HSP-15   |
| 1064LL    | 0             | 29/07/10          | 161                   | <b>Mutación S745L Fks1p</b>                       | 243        | 243 | 308 | 308 | 262 | 262 | 131 | 131 | HSP-16   |
| 474LL     | 0             | 15/02/99          | 173                   |   | 243        | 263 | 308 | 308 | 197 | 197 | 131 | 131 | HSP-17   |
| 928LL     | 84            | 28/07/07          | Urgencias generales   | <b>Aislados no sensibles a las equinocandinas</b> | 243        | 243 | 337 | 337 | 237 | 254 | 143 | 143 | HSP-18   |
| 1161LL    | 6             | 30/10/12          | UCI pediátrica        |   | 240        | 243 | 350 | 350 | 271 | 321 | 104 | 104 | HSP-19   |
| CP-368    | -             | -                 | Hospital la FE        | <b>Cepas externas</b>                             | 223        | 243 | 368 | 368 | 268 | 318 | 129 | 129 | HSP-20   |
| CP-372    | -             | -                 | Hospital la FE        |   | 231        | 269 | 350 | 350 | 268 | 268 | 129 | 129 | HSP-21   |
| RS-16     | -             | -                 | FUNGEMYCA             |   | 240        | 240 | 321 | 321 | 251 | 265 | 145 | 161 | HSP-22   |
| ST-14     | -             | -                 | FUNGEMYCA             |   | 240        | 240 | 321 | 321 | 251 | 251 | 145 | 145 | HSP-23   |
| ATCC22019 | -             | -                 | Cepa control          | <b>Cepa control</b>                               | 243        | 249 | 305 | 305 | 291 | 291 | 131 | 131 | HSP-24   |

\*Aislados incluidos tanto en el estudio de cepas que presentaban relación espacio/ tiempo como en el estudio de aislados que mostraron la mutación S745I en la región HS1 de Fks1p.



## **5. DISCUSIÓN**

---



### **5.1. Incidencia, distribución y perfiles de sensibilidad antifúngica de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* a lo largo de 15 años en un hospital universitario**

La importancia de *C. parapsilosis* como agente patógeno causante de candidemia ha estado aumentando en los últimos años, habiéndose observado un incremento de su frecuencia y una elevada incidencia en los pacientes pediátricos. Los resultados obtenidos en este estudio han corroborado la elevada incidencia de *C. parapsilosis* (20%), que ha sido la segunda especie más frecuente causante de fungemia en nuestro hospital, por delante de *C. tropicalis* (14,4%) y *C. glabrata* (11,7%) y solo por detrás de *C. albicans* (43,1%), que fue la especie más comúnmente aislada durante todo el periodo de estudio.

La distribución de las especies de *Candida* causantes de candidemia observada en nuestro estudio está de acuerdo con la reportada en otros trabajos desarrollados en España, en los que *C. albicans* es la especie más comúnmente aislada, seguida de *C. parapsilosis*; y de *C. tropicalis* y *C. glabrata* que se sitúan en tercer o cuarto lugar dependiendo del estudio (31,32,186). Sin embargo, estos resultados difieren de los reportados en los EUA (41) y en los países nórdicos (30), en los que *C. glabrata* es la segunda especie más comúnmente causante de candidemia, y *C. parapsilosis* se sitúa en tercer o cuarto lugar.

Las causas de esta variabilidad geográfica que presentan *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, no están del todo claras. No obstante, podría estar relacionada, tal y como han sugerido otros autores, a factores como la longevidad de la población, las enfermedades de base de los pacientes y/o la política de uso de los antifúngicos en cada institución (30,42,187,188).

Aunque en nuestro medio, a lo largo de los 15 años del estudio, las tasas de incidencia de las candidemias han mostrado fluctuaciones que oscilan desde una incidencia mínima de 3,3 casos/100.000 habitantes en el año 2009 a un máximo de 7,4 casos/100.000 habitantes en el año 2011, en nuestro estudio, se ha mostrado una tendencia al incremento, con un aumento medio de la tasa de 0,05 casos/100.000

habitantes/año. Esta incidencia es similar a la reportada en estudios recientes en España (31) y en otros países Europeos (19,27) en los que la incidencia varía entre 4,4 y 10,05 casos/100.000 habitantes.

El incremento observado en la incidencia de las candidemias, también ha sido reportado en muchos otros estudio, en los que se ha detectado un aumento de las candidemias (19,20,189), y particularmente de las causadas por especies no-*C. albicans* (188,190). Nuestros resultados también corroboran la reciente observación de un cambio epidemiológico en la distribución de las especies causantes de candidemia, en la que se ha evidenciado un incremento de la prevalencia de las especies no-*C. albicans* y una disminución de *C. albicans*. Así pues, durante los primeros años del estudio (1998 - 2001) se observó que *C. albicans* estaba implicada en el 50% o más de los casos de fungemia, mientras que a partir del año 2002, solo excepcionalmente llegó a ser causa del 40% de las fungemias. Por otro lado, *C. glabrata* fue el cuarto agente más común causante de fungemia hasta el año 2009, año en que se situó en tercer lugar, por delante de *C. tropicalis*. Con respecto a *C. parapsilosis*, también se demostraron algunos cambios de frecuencia, ya que presentó un ligero incremento del 0,33% por año de estudio.

Aunque no están claras las razones por las que se está dando este cambio epidemiológico, algunos estudios han sido capaces de relacionar el incremento de la frecuencia de *C. parapsilosis* y *C. glabrata* con el aumento del uso de determinados antifúngicos para el tratamiento de la candidemia, como la caspofungina y el fluconazol, respectivamente (30,42).

En cuanto a la incidencia de las candidemias estratificada en función del grupo de edad, un dato a destacar de los resultados obtenidos en nuestro estudio es el de las diferentes frecuencias observadas entre *C. parapsilosis* y *C. albicans* en función de la edad. *C. parapsilosis* ha sido la especie más frecuentemente aislada en los pacientes menores de 15 años, estando implicada en el 57,4% de las candidemias diagnosticadas en este grupo de edad, muy por encima del 33,9% correspondiente a las candidemias causadas por *C. albicans*.

Aunque son muchas las publicaciones que corroboran esta elevada prevalencia de *C. parapsilosis* en los pacientes pediátricos, también existen varios estudios publicados en diferentes países que sitúan a *C. albicans* como la especie más frecuente causante de candidemia también en este grupo de pacientes (19,26,46). En España, en el año 2013 (48), se llevó a cabo un estudio epidemiológico sobre las candidemias causadas en la población pediátrica en el que participaron 44 hospitales de 12 comunidades autónomas. Según sus resultados, *C. parapsilosis* causó el 43% de las candidemias, seguida de *C. albicans* que estuvo implicada en el 36% de éstas. No obstante, cuando los resultados se estratificaron por comunidad autónoma, se observó que en Cataluña, comunidad en la que participaron 5 centros hospitalarios, estos porcentajes se invertían, encontrándose una mayor implicación de *C. albicans* (55%) que de *C. parapsilosis* (30%). Estos resultados contrastan con los obtenidos en nuestro estudio y demuestran la existencia de diferencias en la distribución de las especies causantes de la candidemia en las distintas instituciones de una misma región e incluso de una misma ciudad. Lo que alerta sobre la necesidad de llevar a cabo estudios epidemiológicos en cada institución para poder adaptar las guías de recomendación sobre el tratamiento de la candidemia a los hallazgos de cada centro.

Dentro del complejo *C. parapsilosis*, la gran mayoría de las cepas correspondían a *C. parapsilosis* sensu estricto (98,5%), siendo extremadamente baja la frecuencia de *C. orthopsilosis* (1.5%) observada en nuestro estudio y nula la de *C. metapsilosis*. Aunque la mayoría de estudios publicados en los que se analiza la prevalencia de estas dos especies también detectan prevalencias muy bajas, nuestros valores estuvieron por debajo de los detectados en otros estudios españoles en los que la prevalencia de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* varió del 1.6% al 23.5% y del 0.8% al 2.9%, respectivamente (111,112,128,191,192). La baja incidencia que presentan estas dos especies se ha atribuido a un menor grado de virulencia de ambas, como fue demostrado en los trabajos de Tavanti *et al.* (193) y Bertini *et al.* (110) y estaría acorde a nuestros resultados que han detectado una muy baja incidencia de estas dos especies entre aislados en procesos invasivos.

Por otro lado, Miranda-Zapico *et al.* (112) observaron que *C. orthopsilosis* se aislaba con mayor frecuencia de la sangre que de otras muestras clínicas, mientras que contrariamente, *C. metapsilosis* era más comúnmente aislada a partir de exudados

óticos, exudados de heridas y muestras vaginales que de la sangre. También observaron que en los países mediterráneos podría haber una mayor incidencia de *C. orthopsilosis* que de *C. metapsilosis*, en comparación a lo que ocurre en los países más fríos. Sugiriendo que estas variaciones podrían explicarse por las diferencias en los servicios hospitalarios y en la población de pacientes. Estos hallazgos podrían explicar la ausencia de cepas de *C. metapsilosis* en nuestros aislados del complejo *C. parapsilosis* causantes de fungemia.

Con respecto al estudio de sensibilidad de los 68 aislados de *C. parapsilosis* frente a 9 agentes antifúngicos, se detectó una baja prevalencia de cepas resistentes a casi todos los antifúngicos testados a excepción del FLC y del ITC. El porcentaje de cepas de *C. parapsilosis* no sensibles al ITC (4,4%) detectado en nuestro estudio fue similar al reportado en otros estudios españoles, por el contrario, el porcentaje de cepas no sensibles al FLC fue muy superior al observado en otros estudios desarrollados en España, en los que los porcentajes varían del 0% al 5,5% (184,191,194,195). El elevado porcentaje de cepas de *C. parapsilosis* no sensibles al FLC detectado en nuestro estudio podría estar relacionado con un uso excesivo del fluconazol en nuestra institución para el tratamiento de las candidemias causadas por esta especie.

Con respecto a las equinocandinas, todos los aislados mostraron CIM elevadas que ponían en evidencia su reducida sensibilidad intrínseca a las 3 equinocandinas, con valores de CIM<sub>90</sub> de 2 µg/ml para la MFG y la AFG y de 1 µg/ml para la CFG, tal y como ya había sido observado por otros autores (41,196,197). Sólo un aislado fue clasificado con sensibilidad intermedia a la CFG.

No está claro si esta reducida sensibilidad intrínseca a las equinocandinas se correlaciona con un fallo clínico a la hora de tratar una candidemia causada por *C. parapsilosis* con estos antifúngicos, ya que a pesar de que algunas guías de recomendación terapéutica, como las guías IDSA, manifiestan claramente la preferencia del FLC para el tratamiento de las candidemias causadas por *C. parapsilosis*, existen varios estudios que demuestran que el uso de las equinocandinas no influye negativamente en el desenlace clínico final (198). Así se demostró en un estudio de Pfaller *et al.* (178) en el que se comparó la relación entre las CIM frente a las equinocandinas que presentaban las cepas de *C. parapsilosis* aisladas de pacientes con

candidemia tratados con estos antifúngicos y la evolución clínica de los mismos, mostrando que el 88%, el 75%, y el 82% de los pacientes infectados por las cepas de *C. parapsilosis* con CIM  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$  para la AFG, CFG, o MFG, fueron tratados con éxito con equinocandinas. Este hecho sugiere que las fungemias causadas por *C. parapsilosis* pueden ser exitosamente tratadas con estos fármacos, incluso en aquellos aislados que presentan una sensibilidad intermedia a alguno de estos 3 antifúngicos. En nuestro estudio, tan solo detectamos una cepa clasificada como no sensible a la CFG, al FLC y al ITC en un paciente que estaba bajo tratamiento con CFG y, que al igual que se demostró en el estudio de Pfaller, mostró una mejoría notable.

## **5.2. Estudio de sensibilidad a las equinocandinas en *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* y otras especies relevantes de *Candida***

Las equinocandinas son actualmente uno de los antifúngicos más utilizados como tratamiento de primera línea de la candidemia, habiéndose demostrado en un estudio reciente del CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) que, en la actualidad, más del 60% de los pacientes con candidemia, reciben alguna equinocandina como terapia antifúngica ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)). Este generalizado uso de las equinocandinas para el tratamiento de la candidemia hace que sea crucial conocer el mecanismo de acción de estos antifúngicos así como los patrones de sensibilidad y los posibles mecanismos de resistencia de las especies de *Candida* más comunes implicadas en las candidemias.

Es por ello, que uno de los objetivos del presente trabajo era determinar la sensibilidad de *C. parapsilosis* a las equinocandinas y analizar si existían diferencias de sensibilidad entre las diferentes especies del complejo: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

Son varios los estudios que sugieren la existencia de diferencias en los patrones de sensibilidad a las equinocandinas entre las 3 especies del complejo. Estas diferencias parecen estar demostradas en el caso de la AFG y la MFG (114,115,128), pero existe más controversia en el caso de la CFG, ya que determinados estudios detectan

diferencias significativas entre las 3 especies (199), mientras que otros estudios sugieren que no existen tales diferencias (111).

Nuestros resultados del estudio de sensibilidad *in vitro* de las especies del complejo *C. parapsilosis*, también sugieren que existen diferencias en la sensibilidad entre las tres especies del complejo, presentando *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* una mayor sensibilidad a las equinocandinas que *C. parapsilosis*, ya que esta última presentó en general CIM más elevadas, especialmente en el caso de la MFG y la AFG. No obstante, las diferencias observadas fueron, en la mayoría de los casos, de tan sólo una dilución y otra de las principales limitaciones de nuestro estudio fue el limitado número de aislados de *C. orthopsilosis* y de *C. metapsilosis* que se incluyeron, por lo que no se pudo llevar a cabo un análisis estadístico, ya que la N no era lo suficientemente grande como para poder obtener resultados significativos

Estas discrepancias entre estudios, comentadas anteriormente, pueden deberse a diferencias metodológicas en la determinación de las CIM (200), pero hasta tal punto parece evidente esta gran variabilidad en los estudios de la sensibilidad a la CFG, que el (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) no propone puntos de corte para este antifúngico y el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) recomienda que la sensibilidad a las equinocandinas se estudie tan sólo frente a la AFG o a la MFG (201). En esta misma línea, un trabajo reciente de Pfaller *et al.* (2014), en el que se analizan un total de 4.290 aislados de 8 especies distintas de *Candida*, propone que se emplee la AFG como marcador sustituto para predecir la sensibilidad o resistencia frente a la CFG, ya que detectó un porcentaje de acuerdo categórico del 97,1% (202).

En nuestro estudio, cuando comparamos los patrones de sensibilidad frente a las equinocandinas de las cepas de *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis* no sensibles a estos antifúngicos, siguiendo las recomendaciones del estudio de Pfaller, observamos que 20 de las 33 cepas fueron clasificadas exclusivamente como intermedias o resistentes a la CFG y sensibles a la AFG y a la MFG. Por lo que en este caso, si hubiéramos utilizado tan sólo la AFG o la MFG como marcador para predecir la

sensibilidad a la CFG hubiéramos clasificado erróneamente estos 20 aislados como sensibles a las tres equinocandinas.

Por otro lado, al comparar los patrones de sensibilidad frente a las equinocandinas de las cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis* resistentes a estos antifúngicos con los de las cepas de *C. parapsilosis*, pudimos detectar diferencias notables, tal y como ha sido observado por otros autores (160,203,204). La gran mayoría de las cepas de *Candida* resistentes a alguna equinocandina incluidas en el estudio, a excepción de los aislados de *C. parapsilosis*, fueron clasificadas como no sensibles exclusivamente a la CFG (19/28), mientras que en el caso de los aislados de *C. parapsilosis* tan solo un único aislado de los 6 no sensibles, fue intermedio a la CFG. Estos resultados refuerzan la sugerencia de que la CFG es la equinocandina que muestra más eficacia frente a los aislamientos de *C. parapsilosis*, mientras que en las otras especies de *Candida*, la CFG es la equinocandina menos efectiva.

Teniendo en cuenta que cada vez más se recomienda el uso de la MFG y/o la AFG como marcador sustituto para predecir la resistencia frente a la CFG (201,202), y al observar que, siguiendo esta recomendación en nuestra colección de aislados resistentes (33 cepas) hubiéramos clasificado como sensibles a la CFG 20 aislados que eran resistentes, es evidente sugerir que se necesitan llevar a cabo más estudios para poder determinar las razones por las que se observa esta variabilidad en el estudio de sensibilidad a la CFG, y poder establecer una metodología que permita su estudio, ya que existen muchos aislados de *Candida* que son exclusivamente resistentes a la CFG.

### **5.3. Identificación de mutaciones en los genes *FKS* responsables de la resistencia adquirida a las equinocandinas en *C. parapsilosis* y otras especies de *Candida***

El principal mecanismo de resistencia descrito frente a las equinocandinas en *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. kefyr* es la modificación de la diana de acción, la  $\beta$ -(1,3)-D-glucano sintetasa codificada por los genes *FKS* (159). Varios estudios han demostrado estas modificaciones de la diana de acción en aislados de

*Candida* que presentaron elevadas CIM frente a las equinocandinas y que no respondieron al tratamiento con estos antifúngicos y los han relacionado con mutaciones en dos regiones específicas, las regiones Hot Spot (HS), de los genes *FKS1* y *FKS2* (162,205,161). Habiéndose demostrado que estas mutaciones conferirían resistencia a las equinocandinas, al comparar la actividad en presencia de diferentes concentraciones de CFG de una  $\beta$ -(1,3)-D-glucano sintetasa de una cepa sensible de *C. albicans* con la actividad de una  $\beta$ -(1,3)-D-glucano sintetasa mutada obtenida de una cepa de *C. albicans* resistente, y observar que la actividad de esta última no disminuía en presencia del antifúngico (159).

No obstante, en el caso de *C. parapsilosis* no ha sido posible averiguar el mecanismo por el cual esta especie puede adquirir resistencia a estos agentes antifúngicos, ya que, hasta la actualidad, no se ha detectado ningún aislado clínico con resistencia adquirida a las equinocandinas que posea una mutación en las regiones HS del gen *FKS1* (164,130,206).

En nuestro estudio tampoco detectamos ningún aislado que presentase alguna mutación en las regiones HS1/HS2 de los genes *FKS1* o *FKS2*, a excepción de la mutación ya descrita por Garcia-Effron *et al.* (2008) (163), que se cree presente en todas las cepas del complejo *C. parapsilosis*, y fue identificada en todos nuestros aislados de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. Esta mutación natural implica la sustitución aminoacídica de una prolina por una alanina en la posición 660 del gen *FKS1* y se ha sugerido que es la responsable de la menor sensibilidad intrínseca a las equinocandinas que presentan las especies del complejo *C. parapsilosis*. Hecho que ha motivado que esta clase de antifúngicos no esté recomendada como tratamiento de primera línea de las infecciones causadas por esta especie (207,208,94).

En nuestro estudio, todo y haberse demostrado la mutación P660A en toda la colección de aislados, se ha observado que estos presentaban un amplio rango de valores de CIM de CFG (0,06-4), de MFG (0,125-8) y de AFG (0,25-8), de tal modo que, si bien la mayoría de aislados de *C. parapsilosis* presentaron unas CIM muy elevadas de las equinocandinas en comparación con las otras especies de *Candida*, también se identificaron aislados hipersensibles en los que también se había demostrado este polimorfismo. Estos resultados podrían justificar la buena respuesta terapéutica a

las equinocandinas en algunos casos demostrados de candidemia por *C. parapsilosis* (209,198) y sugerirían que esta mutación natural, por si sola, no implica necesariamente un incremento de los valores de CIM y, por tanto, un fracaso terapéutico. Este hecho, también obligaría a la búsqueda de nuevos mecanismos, que, actuando en combinación a este polimorfismo natural, justificasen las habitualmente elevadas CIM de las equinocandinas para *C. parapsilosis*.

Así pues, el hecho de no haber identificado ninguna mutación en la región HS1/HS2 de los genes *FKS1* o *FKS2* en ningún aislado de *C. parapsilosis*, independientemente de las CIM mostradas de las tres equinocandinas, podría sugerir que la presencia de mutaciones en estas regiones, a diferencia de lo que se observa en los aislados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (210,205,204,162,167), no es el principal mecanismo de resistencia adquirida a las equinocandinas en *C. parapsilosis*. En todos los otros estudios publicados hasta la fecha, tampoco se ha podido identificar ningún aislado clínico con resistencia adquirida a alguna de las 3 equinocandinas que presentase mutación en estas regiones (206,111). Tan solo existe descrita una cepa de *C. parapsilosis* que, después de un tratamiento con  $\text{CaCl}_2$  y blanco de calcofluor, desarrolló una mutación en la región HS1 del gen *FKS1* dando lugar a una sustitución aminoacídica en la serina de la posición 645, además incrementó el contenido de quitina presente en la pared celular y redujo la sensibilidad *in vitro* a la caspofungina (175).

No obstante, tal y como puede desprenderse de los resultados de nuestro estudio, existe la posibilidad de que, en el caso de *C. parapsilosis*, las mutaciones implicadas en la resistencia adquirida a las equinocandinas se sitúen fuera de las regiones HS descritas, tal y como ya se demostró en el caso de *S. cerevisiae* (211). De hecho, en nuestro estudio, la sustitución aminoacídica heterocigótica F1386S creemos que podría ser la responsable de la resistencia que presentó un aislado de *C. parapsilosis*, que tenía una CIM de AFG de 8 y de MFG de 4  $\mu\text{g/ml}$ . Pues esta mutación se sitúa a tan solo 10 aminoácidos de la región HS2 del gen *FKS1*, y esta es una posición muy conservada entre las distintas especies de *Candida* y *S. cerevisiae*, al igual que lo es toda la secuencia aminoacídica que comprende las regiones HS1 y HS2 del gen *FKS1*, que entre los aminoácidos 623-1486 tienen una homología  $\geq 81\%$ . Además, si tenemos en cuenta esta homología y extrapolamos la topología de la  $\beta$ -(1,3)-D-glucano sintetasa

que ha estado descrita recientemente para *S. cerevisiae* (151) con la que podría tener en *C. parapsilosis*, vemos que la mutación F1386S queda situada en el exterior de la membrana plasmática, en una zona muy cercana a la región HS2, en donde parece ser se ensamblan las equinocandinas con la enzima, por lo que este ensamblaje podría estar dificultado, y más si tenemos presente que la sustitución aminoacídica podría comportar un cambio drástico en la estructura de la enzima.

A nuestro entender, en este estudio se reportan los primeros resultados de una mutación aminoacídica fuera de las regiones HS del gen *FKSI* que podría tener una clara correlación con la resistencia adquirida a las equinocandinas, aunque a diferencia de lo que ocurre con las mutaciones descritas en las otras especies de *Candida*, esta mutación afecta particularmente a la AFG y a la MFG y no mayoritariamente a la CFG (162,166,203,212).

Esta baja frecuencia de mutaciones que hemos detectado en los aislados de *C. parapsilosis* también ha sido observada en otras especies de *Candida* analizadas en este estudio, corroborando así estudios previos en los que se detectaba una baja frecuencia de mutaciones en cepas no sensibles a las equinocandinas (164). Así, ninguno de los aislados de *C. albicans* y *C. tropicalis* no sensible a al menos una equinocandina han presentado mutaciones en el gen *FKSI*, y solo un único aislado de *C. krusei*, resistente a las 3 equinocandinas, presentó una mutación. Mientras que el 50% de los 12 aislados de *C. glabrata* no sensibles a al menos una equinocandina, presentaron alguna mutación en los genes *FKS*.

En el caso de *C. glabrata*, el 83,3% (5/6) de las mutaciones se detectaron en la región HS1 del gen *FKS2* y el 16,7% (1/6) en la región HS1 del gen *FKSI*, no habiéndose identificado ninguna mutación en las regiones HS2 en ninguno de los dos genes. Esta baja frecuencia de mutaciones en las regiones HS2 de ambos genes ya ha sido reportada en otros estudios (162) y es por ello que las técnicas desarrolladas para la detección rápida de SNP (*single nucleotide polymorphism*) en los genes *FKS* de *C. glabrata* se basan solo en el análisis de la región HS1 de ambos genes (213).

En nuestro estudio, las distintas mutaciones resultaron en diferentes grados de resistencia a las equinocandinas, siendo difícil relacionar una mutación particular con la

resistencia a una o varias equinocandinas en concreto, lo que coincide con la variabilidad que otros autores ya habían observado en las CIM de las equinocandinas de diferentes aislados con una misma mutación (167,214,215).

Por otro lado, en un estudio desarrollado por Shields *et al.* (165) se sugirió que la ausencia o presencia de mutaciones en los genes *FKS* podía predecir con mayor exactitud la respuesta terapéutica a las equinocandinas en el paciente con candidiasis invasiva que lo que podían predecirlo las propias CIM de las cepas aisladas. No obstante, en nuestro caso, 6 de los aislados de *C. glabrata* no sensibles a las equinocandinas no presentaron mutaciones, tres de ellos eran resistentes al CFG (CIM=0,5, 1, 1), uno resistente a las 3 equinocandinas (CIM=1), y los otros dos tenían una sensibilidad intermedia a la CFG (CIM=0,25). Aunque se ha correlacionado el fracaso terapéutico con la presencia de mutaciones y valores de CIM de las equinocandinas elevados (166), también existen algunos estudios que han demostrado una buena respuesta terapéutica a las equinocandinas en casos de candidemia por cepas de *C. glabrata* con mutaciones en los genes *FKS* (214), pero se desconoce como responderían las cepas de *Candida* que presentan CIM elevadas de las equinocandinas pero que no poseen mutaciones en los genes *FKS*, como es el caso de las 6 cepas de *C. glabrata* encontradas en nuestro estudio.

Este desconocimiento de la correlación entre CIM y respuesta terapéutica a las equinocandinas ha obligado a eliminar los puntos de corte aceptados para la CFG (202) y justifica llevar a cabo más estudios para poder esclarecer cuales son los mecanismos de resistencia a las equinocandinas y como detectarlos, para poder conocer con exactitud cuando las equinocandinas pueden ser utilizadas y cuando no.

En el caso de *C. krusei*, como ya se ha comentado, solo se detectó una mutación en el gen *FKSI* de uno de los 13 aislados estudiados, el que presentó una mayor resistencia las 3 equinocandinas, siendo resistente a la CFG y a la MFG e intermedio a la AFG.

Por el contrario, los 7 aislados estudiados de *C. krusei* no sensibles presentaron la misma mutación L701M, que aun estando situada fuera de la región HS1 (655-663) del gen *FKSI*, ha sido implicada en la resistencia a las equinocandinas por varios

estudios (204,161,216,217,178), todo y que en ninguno de ellos se ha estudiado la presencia de esta mutación en cepas de *C. krusei* sensibles a las equinocandinas. En nuestro estudio, incluimos 6 aislados de *C. krusei* epidemiológicamente no relacionados y sensibles a las 3 equinocandinas, y observamos que todos ellos presentaron la mutación L701M, por lo que se deduce que esta mutación no está relacionada con la resistencia a las equinocandinas y que, posiblemente, lo que ocurra, es que la secuencia aminoacídica de la Fks1p de la cepa *C. krusei* ATCC 6258 publicada en el GenBank, es la que presenta la mutación, siendo en realidad la meteonina el aminoácido WT y la leucina el aminoácido mutado.

Según los resultados de nuestro estudio, puede afirmarse que la frecuencia de mutaciones en las regiones HS de los genes *FKS1* y *FKS2* es baja en *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* y moderada en *C. glabrata*, tanto en el caso de cepas sensibles a las equinocandinas como en cepas resistentes, lo que sugiere la posible existencia de mutaciones en otras regiones HS aún no descritas, y/o la posible implicación de otros mecanismos de resistencia alternativos a la modificación de la diana de acción, como se discute en el siguiente apartado.

Debido al bajo porcentaje de mutaciones detectadas, no nos ha sido posible establecer una correlación directa entre una determinada mutación y la resistencia a determinadas equinocandinas. Todo y que, parece ser que la mutación S663P en el gen *FKS2* de y la mutación S629P del gen *FKS1* de *C. glabrata* son las sustituciones aminoacídicas más comunes y las que otorgan una mayor resistencia a las equinocandinas.

De todos modos, la creciente incidencia de aislados de *Candida* resistentes a las equinocandinas es un motivo de preocupación, y puesto que hasta la actualidad no se ha demostrado claramente la existencia de otros mecanismos que no sean la modificación de la diana por mutaciones en los genes *FKS* y además parece no existir una correlación directa entre los resultados de las CIM y la respuesta terapéutica, cada vez se cree más necesario disponer de técnicas moleculares que permitan detectar rápidamente estas mutaciones, que aunque pueden afectar el *fitness* de las cepas y reducir su tasa de crecimiento (218) también se han asociado a fracasos terapéuticos

#### **5.4. Implicación de los niveles basales de quitina en la reducida sensibilidad intrínseca y adquirida a las equinocandinas en *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis***

Los hongos presentan la capacidad de remodelar la estructura de su pared celular en el caso de que ésta haya sido alterada o dañada por factores externos, pudiendo así mantener la integridad celular (171). Estudios previos demostraron que *C. albicans* es capaz de responder a la inhibición de la síntesis del  $\beta$ -(1,3)-D-glucano mediante un incremento en el contenido de quitina de su pared celular (172), protegiendo así a la célula del daño causado en ésta por las equinocandinas y manteniendo su integridad celular. Además, se observó que este incremento en los niveles de quitina de la pared celular también comportaba una reducción de la sensibilidad de las cepas frente a las equinocandinas, tanto *in vitro* como *in vivo* (172,174). Estos hallazgos sugirieron que era posible que este incremento de la biosíntesis de quitina pudiese ser un mecanismo que estuviese implicado en la resistencia o tolerancia a las equinocandinas.

En nuestro estudio tratamos de evaluar la posible relación entre los niveles de quitina de la pared celular de *C. parapsilosis* y la resistencia a las equinocandinas, para ello analizamos los niveles basales de quitina en las tres especies del complejo *parapsilosis*, comparamos los niveles de las cepas sensibles con los de las cepas resistentes y determinamos si estos niveles se modificaban después del tratamiento con equinocandinas.

Cuando estudiamos los niveles basales de quitina de los aislados de *C. parapsilosis*, lo primero que llama la atención es su gran variabilidad, tal y como ya había sido observada en un estudio previo desarrollado por Walker *et al.* (2013) (175) en el que se analizaban los niveles basales de quitina de 5 aislados de *C. parapsilosis* sensibles a las 3 equinocandinas obtenidos de diferentes orígenes biológicos.

Al comparar los niveles basales de quitina de las tres especies del complejo *parapsilosis* no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas estudiadas, por lo que parece ser que la composición de la pared celular de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* es muy similar, a pesar de las

diferencias que se han observado entre ellas en cuanto a lo que hace referencia a sensibilidad antifúngica (114,115,128) y virulencia (110,122) Por lo que, según nuestros resultados, las diferencias descritas entre las tres especies del grupo deberían justificarse por otros motivos distintos a los de la composición de la pared celular

Cuando comparamos los niveles basales de quitina de los aislados de *C. parapsilosis* sensibles y no sensibles a las equinocandinas continuamos observando una gran variabilidad, y a pesar de que las dos cepas que presentaron los niveles de quitina más bajos fueron los dos aislados más resistentes a las equinocandinas, uno de ellos con la mutación F1386S, los aislados no sensibles presentaron de media unos niveles basales de quitina ligeramente superiores a los detectados en los aislados sensibles, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Así pues, parece ser que los niveles basales de quitina no están directamente asociados a la resistencia adquirida a las equinocandinas en *C. parapsilosis*, ya que los aislados no sensibles han presentado una concentración de quitina muy similar, aunque de media ligeramente superior, a los aislados sensibles a las 3 equinocandinas.

Al determinar los niveles de quitina presentes en la pared celular, de las 8 cepas que habían sido tratadas con CFG y compararlos con sus niveles basales, pudimos observar que la mayoría de los aislados incrementaron entre un 1 y un 3% los niveles de quitina, a excepción de los dos aislados que habían presentado los niveles basales de quitina más bajos, que incrementaron la concentración de quitina en un 7 y un 11%. En el estudio de Walker *et al.* (2013) (175) también se observó un incremento del nivel de quitina de la pared celular después de un tratamiento con CFG en una cepa que poseía una mutación en la región HS1 del gen *FKSI*.

Aunque faltaría conocer como se comportan estas cepas al ser expuestas a diferentes concentraciones de CFG, estos hechos podrían sugerir que existe una relación entre la resistencia a las equinocandinas y la capacidad de incrementar los niveles basales de quitina para asegurar la estabilidad y la integridad celular, ya que las cepas resistentes a las equinocandinas son las que han incrementado más los niveles de quitina al verse expuestas a la CFG.

A favor de esta correlación entre resistencia a las equinocandinas y niveles de quitina en la pared celular también está la diferencia observada entre los niveles de quitina del complejo *parapsilosis* y los determinados en la cepa de referencia *C. albicans* SC5314, que fueron significativamente inferiores en esta última, al igual que ocurre con los valores de las CIM de las equinocandinas que siempre son mucho más elevados en las especies del complejo *C. parapsilosis* que en *C. albicans*, aun considerándose sensibles en ambas especies. De todos modos, esta observación debería comprobarse analizando muchas más cepas de otras especies diferentes a *C. parapsilosis*.

Ya que podría ser que en las especies del complejo *C. parapsilosis* el contenido basal de quitina participase de algún modo en su reducida sensibilidad a las equinocandinas, se cree que este carbohidrato podría ser una diana de acción eficaz para dirigir el tratamiento de las infecciones causadas por estas especies (219). Se sabe que las vías de señalización de la pared celular PKC, HOG y calcineurina/Ca<sup>2+</sup> son las encargadas de regular la expresión de los genes *CHS* que codifican para las enzimas Chsp que sintetizan la quitina (171), y que la ciclosporina A y el tacrolimus (FK506) son fármacos que inhiben la actividad de la calcineurina, así como la Nikomicina Z que inhibe la actividad de la Chsp y consecuentemente de la biosíntesis de la quitina. Por lo que un tratamiento combinado con una equinocandina y un inhibidor de la vía de la calcineurina o de la Chsp debería mejorar la eficacia del tratamiento con equinocandinas, ya que se inhibirían simultáneamente dos de los principales componentes de la pared celular de los hongos. En esta línea, recientemente, se ha publicado un estudio desarrollado por Cordeiro *et al.* (2014) (219), en el que se demuestra que existe sinergismo entre la ciclosporina A y diversos antifúngicos, incluyendo entre ellos la caspofungina, en aislados de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. Aunque ya se habían comunicado previamente resultados similares en *C. albicans* (220), *A. fumigatus* (221), *C. glabrata* (222) y *Cryptococcus neoformans* (223), es necesario llevar a cabo más estudios para asegurar que existe sinergia entre las equinocandinas y los inhibidores de la vía de calcineurina o el inhibidor de la Chsp y poder asegurar la utilidad terapéutica de terapias antifúngicas combinadas con estos inhibidores.

## 5.5. Detección de un genotipo endémico de *C. parapsilosis*

La existencia de cepas endémicas en un determinado centro hospitalario y su difusión a lo largo del tiempo dando lugar a brotes epidémicos con más o menos casos es algo ya conocido (224) pero difícil de detectar, especialmente cuando el número de casos es escaso y estos están muy espaciados en el tiempo.

En nuestro estudio, al realizar el análisis retrospectivo de los aislamientos de *C. parapsilosis* en busca de mutaciones en los genes *FKS*, llamó la atención la existencia de una misma mutación, no previamente descrita y por tanto no previsible, que se repetía en 5 cepas del total de las 68 cepas de *C. parapsilosis* que habían sido aisladas en los hemocultivos de nuestro hospital a lo largo de 15 años (1997-2011). Por lo que se decidió tipificar las cepas para conocer si eran clonales.

Para la tipificación de las cepas de *C. parapsilosis* se utilizó la técnica de los microsatélites descrita por Sabino *et al.* (137) que es, en la actualidad, una de las técnicas más utilizadas para la tipificación de microorganismos por su elevado poder discriminatorio (225–230). En nuestro estudio, esta técnica ha mostrado ser extremadamente útil para la tipificación de los aislados de *C. parapsilosis*, habiendo mostrado un poder discriminatorio del 0,99, a pesar de que se considera que *C. parapsilosis* es una especie muy homogénea (125).

Una gran desventaja de los microsatélites es, por el contrario, la limitada reproducibilidad entre laboratorios que presentan, lo cual limita enormemente la comparación de los resultados. Esta limitación ha sido también observada en nuestro estudio al querer comparar los genotipos identificados con los observados en otros estudios, como el desarrollado recientemente por Delfino *et al.* (231) que, al igual que nosotros, incluía como cepa de referencia la *C. parapsilosis* ATCC 22019. Al comparar los 8 alelos de los 4 *loci* analizados de ambas cepas, observamos que había una diferencia de un nucleótido. Esta limitación también ha sido observada en otras especies de hongos, como *Aspergillus fumigatus* (230), pero en alguno de estos casos, se ha solucionado la reproducibilidad entre laboratorios (232) diseñando los *allelic leadders*, que son una mezcla de alelos de longitudes conocidas empleados para normalizar las longitudes de los fragmentos obtenidos. Deberían diseñarse *allelic leadders* con los

alelos más comunes de *C. parapsilosis* para aumentar la reproducibilidad entre laboratorios de los microsatélites.

Empleando los microsatélites, encontramos que 3 de las 5 cepas que presentaban la misma mutación en el gen *FKSI* eran clonales y que las otras 2 solo se diferenciaban de estas por cambios menores en uno o dos alelos de entre los 8 estudiados, tratándose probablemente de dos microvariantes de la cepa clonal. Así pues, en nuestro hospital, existió una cepa de *C. parapsilosis* que estuvo en circulación causando fungemias, como mínimo durante un periodo de 6 años, entre los años 2000 y 2005, o de 13 si se considera que las otras dos cepas, aisladas los años 1998 y 2010, son microvariantes del genotipo endémico. Ya se ha comentado que era conocida la existencia de cepas endémicas que se habían mantenido durante largos periodos de tiempo en un mismo centro (224), pero en nuestro caso se trataría del periodo de tiempo documentado más largo.

En nuestro estudio no se incluyeron cepas de *C. parapsilosis* de origen ambiental y, al ser un estudio retrospectivo, no se hicieron controles de portadores, pero el hecho de que el último aislamiento del clon date de abril de 2010 y el hospital hubiese cambiado de ubicación en octubre de 2010, hace suponer un reservorio telúrico y no una transmisión horizontal mediada por el personal sanitario, tal y como se ha demostrado en otros estudios (231). Los resultados de este estudio confirman la existencia de cepas de *Candida* endémicas en salas o centros hospitalarios y su posibilidad de causar brotes epidémicos que solo pueden ser detectados con estudios de clonalidad y para los que deben desarrollarse estrategias de prevención y control.



## **6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**

---



1. Se ha observado una tendencia al incremento en la incidencia de las candidemias, acompañada de un cambio epidemiológico en el que la prevalencia de *C. albicans* ha disminuido y la prevalencia de *C. parapsilosis* y *C. glabrata* ha tendido a aumentar.
2. La implicación de *C. parapsilosis* como agente causal de candidemia en nuestro hospital a lo largo de un periodo de 15 años ha sido elevada (20%), afectando principalmente a los pacientes pediátricos (menores de 1 año: 66.7%; 2-14 años: 50%), grupo en el que ha sido la especie más comúnmente aislada.
3. La implicación de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* como agentes causantes de candidemia en nuestro hospital a lo largo de un periodo de 15 años ha sido extremadamente baja en el caso de *C. orthopsilosis* y nula en *C. metapsilosis*.
4. Todos los agentes antifúngicos evaluados mostraron una excelente actividad frente a los aislados de *C. parapsilosis*, detectando una baja frecuencia de resistencias, a excepción del itraconazol, para el que el 23,5% de los aislados fueron clasificados como no sensibles.
5. La caspofungina ha demostrado ser, de las tres equinocandinas, la más eficaz frente a *C. parapsilosis*, contrariamente a lo que se ha observado en las otras especies de *Candida* incluidas en el estudio, las cuales presentan una menor sensibilidad a la caspofungina que a las otras dos equinocandinas.
6. La frecuencia de mutaciones adquiridas en el gen *FKSI* en aislados de *C. parapsilosis* sensibles y no sensibles a las equinocandinas ha sido extremadamente baja y todas las mutaciones han sido detectadas fuera de las regiones HS.
7. De las 11 mutaciones adquiridas detectadas en el gen *FKSI* en los 78 aislados de *C. parapsilosis* estudiados, solo una única mutación (F1386S), identificada en

- un aislado resistente, podría estar asociada con el fenotipo de resistencia a las equinocandinas.
8. La ausencia de mutaciones en el gen *FKS2* de los aislados de *C. parapsilosis* sugiere la no implicación de este gen como mecanismo de resistencia a las equinocandinas.
  9. La baja frecuencia de mutaciones adquiridas identificadas en los aislados de *C. parapsilosis* y en los aislados de las otras especies de *Candida* incluidas en el estudio que eran no sensibles a las equinocandinas, así como el posible papel de la mutación descrita F1386S situada fuera de las regiones HS, sugieren la existencia de mecanismos de resistencia relacionados con mutaciones en otras regiones del gen *FKS1* diferentes a las regiones HS o la existencia de mecanismos de resistencia alternativos.
  10. El contenido basal de la glucosamina, glucosa y manosa presente en la pared celular de los aislados de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* es similar, lo que sugiere que la composición de la pared celular podría ser la misma entre las especies del complejo *C. parapsilosis*.
  11. No se han detectado diferencias en el contenido basal de quitina entre los aislados estudiados de *C. parapsilosis* sensibles y no sensibles a las equinocandinas.
  12. Los aislados de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* tienen un elevado contenido de quitina basal en comparación con el aislado control de *C. albicans*, lo que podría sugerir que este alto contenido de quitina basal puede estar implicado en la reducida sensibilidad intrínseca que estas especies muestran a las equinocandinas.
  13. Se ha observado un incremento de los niveles de quitina de la pared celular después del tratamiento con caspofungina, especialmente en los aislados de *C. parapsilosis* resistentes a alguna equinocandina, lo que podría sugerir que se

tratase de una respuesta compensatoria que podría estar implicada en los mecanismos de resistencia adquirida a estos antifúngicos.

14. Se ha detectado la presencia de una cepa endémica de *C. parapsilosis*, con un posible reservorio telúrico, que ha permanecido en nuestro hospital un periodo mínimo de 6 años.

1. A trend toward an increase in the incidence of candidemia has been observed, together with an epidemiological change in which the prevalence of *C. albicans* has reduced and the prevalence of *C. parapsilosis* and *C. glabrata* has trended upwards.
2. The implication of *C. parapsilosis* as a causal agent of candidemia in our hospital during a 15-year period has been high (20%), mainly affecting paediatric patients (less than 1 year: 66.7%; 2-14 years: 50%), the group in which this has been the most common specie isolated.
3. The implication of *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* as causal agents of candidemia in our hospital during a 15-year period has been extremely low in the case of *C. orthopsilosis* and nil in *C. metapsilosis*.
4. All the antifungal agents tested showed an excellent activity against *C. parapsilosis* isolates, observing a very low frequency of resistance, except for itraconazole, for which 23.5% of the isolates were classified as non-susceptible.
5. Caspofungin has proved to be the most effective echinocandin of the three against *C. parapsilosis*, contrary to what has been observed in the other *Candida* species included in the study, which have shown a lower susceptibility to caspofungin than to the other two echinocandins.
6. The frequency of acquired mutations in the *FKSI* gene in echinocandin susceptible and non-susceptible *C. parapsilosis* isolates has been extremely low and all the mutations have been identified outside the HS regions.
7. Among the 11 acquired mutations detected in the *FKSI* gene in the 78 *C. parapsilosis* isolates studied, only a single mutation (F1386S), identified in a resistant isolate, could be associated with the phenotype resistant to echinocandins.

8. The absence of mutations in *FKS2* gene of *C. parapsilosis* isolates suggests a lack of involvement of this gene as resistance mechanism to echinocandins.
9. The low frequency of acquired mutations identified in *C. parapsilosis* isolates and in the echinocandin non-susceptible *Candida* spp. isolates included in the study, as well as the possible role of the F1386S mutation located outside the HS regions, suggest the existence of resistant mechanisms related with mutations in other regions of the *FKSI* gene or the existence of alternative resistant mechanisms.
10. The basal content of glucosamine, glucose and mannose present in the cell wall of *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* isolates is similar, which suggests that the cell wall composition of the species of the *C. parapsilosis* complex may be the same.
11. Differences have not been detected in the basal chitin content among the echinocandin susceptible and non-susceptible *C. parapsilosis* isolates studied.
12. Compared to the *C. albicans* control strain, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* isolates have an elevated basal chitin content, which suggests that this high basal chitin content may be implied in the intrinsic reduced echinocandin susceptibility that these species show against echinocandins.
13. An increase in the chitin levels of the cell wall after treatment with caspofungin has been observed, particularly in the *C. parapsilosis* isolates resistant to some echinocandin, which could suggest that it was a compensatory response that may be implied in their acquired resistant mechanism to these antifungal agents.
14. The presence of an endemic *C. parapsilosis* isolate, with possible telluric reservoir, that has remained in our hospital at least during a 6-year period has been detected.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**

---



1. Tortorano AM, Prigitano A, Lazzarini C, Passera M, Deiana ML, Cavinato S, *et al.* A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. *Infection*. 2013;41(3):655–62.
2. Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Schønheyder HC, Knudsen JD, Jensen IM, *et al.* Semi-national surveillance of fungaemia in Denmark 2004–2006: increasing incidence of fungaemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(5):487–94.
3. Hammoud MS, Al-Taiar A, Fouad M, Raina A, Khan Z. Persistent candidemia in neonatal care units: risk factors and clinical significance. *Int J Infect Dis*. 2013;17(8):e624–8.
4. Luzzati R, Cavinato S, Giangreco M, Granà G, Centonze S, Deiana ML, *et al.* Peripheral and total parenteral nutrition as the strongest risk factors for nosocomial candidemia in elderly patients: a matched case-control study. *Mycoses*. 2013;56(6):664–71.
5. Chow JK, Golan Y, Ruthazer R, Karchmer AW, Carmeli Y, Lichtenberg DA, Chawla V, Young JA HS. Risk factors for albicans and non-*albicans* candidemia in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 2008;36(7):1993–8.
6. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998;31(1):327–32.
7. Karlowsky JA, Zhanel GG, Klym KA, Hoban DJ, Kabani AM. Candidemia in a Canadian tertiary care hospital from 1976 to 1996. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1997;29(1):5–9.
8. Meyer E, Geffers C, Gastmeier P, Schwab F. No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011. *Euro Surveill*. 2013;18(24):1–8.
9. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004;39(3):309–17.
10. Asensio Á, Cantón R, Vaqué J. Etiología de las infecciones hospitalarias en España (EPINE, 1990–1999). *Med Clin*. 2002;118(19):725–30.
11. Ortega M, Marco F, Soriano A. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect*. 2011;77(2):157–61.
12. McGowan JE, Barnes MW, Finland M. Bacteremia at Boston City Hospital: Occurrence and mortality during 12 selected years (1935–1972), with special *reference* to hospital-acquired cases. *J Infect Dis*. 1975;132(3):316–35.

13. Horn R, Wong B, Kiehn TE AD. Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset, and results of therapy. *Rev Infect Dis.* 1985;7(5):646–55.
14. Beck-sague CM, Jarvis WR. Secular Trends in the Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis.* 1993;167(5):1247–51.
15. Komshian SV, Uwaydah AK, Sobel JD CL. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev Infect Dis.* 1989;11(3):379–90.
16. Pittet D WR. Nosocomial Bloodstream Infections Secular Trends in Rates, Mortality, and Contribution to Total Hospital Deaths. *Arch Intern Med.* 1995;155(11):1177–84.
17. Haug JB, Harthug S, Kalager T, Digranes A, Solberg CO. Bloodstream infections at a Norwegian university hospital, 1974-1979 and 1988-1989: changing etiology, clinical features, and outcome. *Clin Infect Dis.* 1994;19(2):246–56.
18. Jr VK, Kovacicova G. Longitudinal 10-year prospective survey of fungaemia in Slovak Republic: trends in etiology in 310 episodes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;36(1):7–11.
19. Arendrup MC, Dzajic E, Jensen RH, Johansen HK, Kjaeldgaard P, Knudsen JD, *et al.* Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(8):E343–53.
20. Fortún J, Martín-Dávila P, Gómez-García de la Pedrosa E, Pintado V, Cobo J, Fresco G, *et al.* Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. *J Infect.* 2012;65(1):64–70.
21. Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fuursted K, Johansen HK, Kjaeldgaard P, *et al.* National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J Clin Microbiol.* 2011;49(1):325–34.
22. Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, *et al.* Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(5):1181–7.
23. Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Elsayed S. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(3):532–7.
24. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(1):45–8.

25. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR, *et al.* Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clin Infect Dis.* 2012;55(10):1352–61.
26. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, *et al.* Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One.* 2013;8(3):e59373.
27. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Gottfredsson M. Nationwide study of candidemia, antifungal use, and antifungal drug resistance in Iceland, 2000 to 2011. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3):841–8.
28. Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, Jacobsen MD, Wright P, Whyte J a, *et al.* One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 8):1066–75.
29. Ericsson J, Chryssanthou E, Klingspor L, Ljungman P, Svensson E, Institutet K, *et al.* Candidaemia in Sweden: a nationwide prospective observational survey. *Clin Microbiol Infect.* 2012;19(4):E218–21.
30. Poikonen E, Lyytikäinen O, Anttila V-J, Koivula I, Lumio J, Kotilainen P, *et al.* Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. *BMC Infect Dis.* 2010;10(1):312.
31. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, *et al.* Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2013;20(4):O245–54.
32. Rodríguez-Hernández MJ, Ruiz-Pérez de Pipaon M, Márquez-Solero M, Martín-Rico P, Castón-Osorio JJ, Guerrero-Sánchez FM, *et al.* [Candidemias: multicentre analysis in 16 hospitals in Andalusia (Spain)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(5):328–33.
33. Bassetti M, Taramasso L, Nicco E, Molinari MP, Mussap M, Viscoli C. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. *PLoS One.* 2011;6(9):e24198.
34. Vogiatzi L, Ilia S, Sideri G, Vagelakoudi E, Vassilopoulou M, Sdougka M, *et al.* Invasive candidiasis in pediatric intensive care in Greece: a nationwide study. *Intensive Care Med.* 2013;39(12):2188-95.
35. Kreusch A, Karstaedt AS. Candidemia among adults in Soweto, South Africa, 1990-2007. *Int J Infect Dis.* 2013;17(8):e621–3.
36. Ma C, Li F, Shi L, Hu Y, Wang Y, Huang M, *et al.* Surveillance study of species distribution, antifungal susceptibility and mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in China. *BMC Infect Dis.* 2013;13:337.

37. Sharon Chen, Monica Slavin, Quoc Nguyen, Deborah Marriott, E. Geoffrey Playford, David Ellis TS. Active Surveillance for Candidemia, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(10):1508–16.
38. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(1):42–8.
39. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis.* 2002;35(5):627–30.
40. Hazen KC, Baron EJ, Colombo AL, Girmenia C, Sanchez-sousa A, Palacio A, *et al.* Comparison of the Susceptibilities of *Candida* spp. to Fluconazole and Voriconazole in a 4-Year Global Evaluation Using Disk Diffusion. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5623–32.
41. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, *et al.* Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3435–42.
42. Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect.* 2008;56(2):126–9.
43. Sandven P, Bevanger L, Digranes A, Haukland HH, Mannsåker T, Gaustad P. Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. *J Clin Microbiol.* 2006;44(6):1977–81.
44. González G, Elizondo M, Ayala J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year. *J Clin Microbiol.* 2008;46(9):2902–5.
45. Ece G, Samlioglu P, Akkoçlu G, Atalay S, Kose S. The evaluation of the distribution of yeast like fungi “*Candida* Species” at a tertiary care center in western Turkey. *Int J Med Sci.* 2012;9(7):617–20.
46. Córdoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat ME, Taverna C, Szusz W, Murisengo O, *et al.* Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2011;43(3):176–85.
47. Juyal D, Sharma M, Pal S, Rathaur VK, Sharma N. Emergence of non-*albicans* *Candida* species in neonatal candidemia. *N Am J Med Sci.* 2013;5(9):541–5.
48. García-Rodríguez J, Cantón E, Pemán J, Alvarez M, Ezpeleta G, Gómez-Nieto A, *et al.* Incidencia etaria y geográfica y patrón de sensibilidad a los antifúngicos de las especies de *Candida* causantes de candidemia en la población pediátrica española. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(6):363–8.

49. Arendrup MC. *Candida* and Candidaemia: Susceptibility and Epidemiology. *Dan Med J*. 2013;60(11):B4698.
50. Poikonen E, Lyytikäinen O, Anttila V-J, Ruutu P. Candidemia in Finland, 1995-1999. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(8):985–90.
51. Shorr AF, Lazarus DR, Sherner JH, Jackson WL, Morrel M, Fraser VJ, *et al*. Do clinical features allow for accurate prediction of fungal pathogenesis in bloodstream infections? Potential implications of the increasing prevalence of non-*albicans* candidemia. *Crit Care Med*. 2007;35(4):1077–83.
52. Lin M, Carmeli Y, Zumsteg J. Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(11):4555–60.
53. Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DS, *et al*. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis*. 1999;29(5):1164–70.
54. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon M, Arthington-skaggs BA, Mirza SA, *et al*. Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and *In Vitro* Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and *In Vitro* Susc. *J Clin Microbiol*. 2004;1519–27.
55. Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FJ, del Castillo M. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(6):380–4.
56. Saiman L, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Dawson J, *et al*. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19(4):319–24.
57. Van Asbeck EC, Huang Y-C, Markham AN, Clemons K V, Stevens DA. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia*. 2007;164(6):287–93.
58. Levin AS, Costa SF, Mussi NS, Basso M, Sinto SI, Machado C, *et al*. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998;30(4):243–9.
59. Chow JK, Golan Y, Ruthazer R, Karchmer AW, Carmeli Y, Lichtenberg D, *et al*. Factors associated with candidemia caused by non-*albicans* *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2008;46(8):1206–13.

60. Badenhorst L, Botha PL, van Rensburg MN. The incidence of hospital fungal infections--yeast fungaemia. *S Afr Med J*. 1991;79(6):302-3.
61. Krcmery V, Oravcova E, Spanik S, Mrazova-Studena M, Trupl J, Kunova A, *et al*. Nosocomial breakthrough fungaemia during antifungal prophylaxis or empirical antifungal therapy in 41 cancer patients receiving antineoplastic chemotherapy: analysis of aetiology risk factors and outcome. *J Antimicrob Chemother*. 1998;41(3):373-80.
62. Fochtman A, Forstner C, Hagmann M, Keck M, Muschitz G, Presterl E, *et al*. Predisposing factors for candidemia in patients with major burns. *Burns*. 2014;41(2):326-32.
63. Omer AK, Ziakas PD, Anagnostou T, Coughlin E, Kourkoumpetis T, McAfee SL, *et al*. Risk factors for invasive fungal disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single center experience. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(8):1190-6.
64. Chen C-Y, Huang S-Y, Tsay W, Yao M, Tang J-L, Ko B-S, *et al*. Clinical characteristics of candidaemia in adults with haematological malignancy, and antimicrobial susceptibilities of the isolates at a medical centre in Taiwan, 2001-2010. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(6):533-8.
65. Lortholary O, Petrikos G, Akova M, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bassetti M, *et al*. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: patients with HIV infection or AIDS. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 Suppl 7:68-77.
66. Redmond HP, Shou J, Kelly CJ, Leon P DJ. Protein-calorie malnutrition impairs host defense against *Candida albicans*. *J Surg Res*. 1991;50(6):552-9.
67. Krause W, Matheis H, Wulf K. Fungaemia and funguria after oral administration of *Candida albicans*. *Lancet*. 1969;1(7595):598-9.
68. Hu B, Du Z, Kang Y, Zang B, Cui W, Qin B, *et al*. Catheter-related *Candida* bloodstream infection in intensive care unit patients: a subgroup analysis of the China-SCAN study. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):594.
69. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. 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. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(8):1192-8.
70. Brian Smith P, Steinbach WJ, Benjamin DK. Invasive *Candida* infections in the neonate. *Drug Resist Updat*. 2005;8(3):147-62.
71. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2006;20(3):485-506.

72. Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis.* 2005;41(9):1232–9.
73. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, *et al.* Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 2003;37(9):1172–7.
74. Inci M, Atalay M, KOÇ A. Investigating virulence factors of clinical *Candida* isolates in relation to atmospheric conditions and genotype. *Turkish J Med Sci.* 2012;42:1476–83.
75. Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-estrella M, Planes AM, Almela M, *et al.* Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1829.
76. Velasco E, Portugal RD. Factors prompting early central venous catheter removal from cancer patients with candidaemia. *Scand J Infect Dis.* 2011;43(1):27–31.
77. Liu CY, Huang LJ, Wang WS, Chen TL, Yen CC, Yang MH, *et al.* Candidemia in cancer patients: impact of early removal of non-tunneled central venous catheters on outcome. *J Infect.* 2009;58(2):154–60.
78. Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, *et al.* Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(1):39.e1–15.
79. Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001;20(12):864–70.
80. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis.* 2013;56(9):1284–92.
81. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikian-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, *et al.* ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18 Suppl 7:9–18.
82. Huang L, Zhang YY, Sun LY. Time to positivity of blood culture can predict different *Candida* species instead of pathogen concentration in candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(7):917–22.
83. Ellis M, Al-Ramadi B, Bernsen R, Kristensen J, Alizadeh H, Hedstrom U. Prospective evaluation of mannan and anti-mannan antibodies for diagnosis of

- invasive *Candida* infections in patients with neutropenic fever. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 5):606–15.
84. Lin MT, Lu HC, Chen WL. Improving efficacy of antifungal therapy by polymerase chain reaction-based strategy among febrile patients with neutropenia and cancer. *Clin Infect Dis*. 2001;33(10):1621–7.
  85. Klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(8):745–53.
  86. McMullan R, Metwally L, Coyle P V, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, *et al*. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clin Infect Dis*. 2008;46(6):890–6.
  87. Jamal WY, Ahmad S, Khan ZU, Rotimi VO. Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. *Int J Infect Dis*. 2014;26:167–70.
  88. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, *et al*. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48(5):503–35.
  89. Hope WW, Castagnola E, Groll a H, Roilides E, Akova M, Arendrup MC, *et al*. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by *Candida* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 Suppl 7:38–52.
  90. Ullmann AJ, Cornely OA, Donnelly JP, Akova M, Arendrup MC, Arian-Akdagli S, *et al*. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: developing European guidelines in clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 Suppl 7:1–8.
  91. Ullmann a J, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arian-Akdagli S, *et al*. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 Suppl 7:53–67.
  92. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, *et al*. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 Suppl 7:19–37.
  93. Gadea I, Cuenca-Estrella M. [Guidelines for fungal diagnoses and antifungal sensitivity studies]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(1):32–9.

94. Aguado JM, Ruiz-Camps I, Muñoz P, Mensa J, Almirante B, Vázquez L, *et al.* [Guidelines for the treatment of Invasive Candidiasis and other yeasts. Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). 2010 Update]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(5):345–61.
95. Ashford B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am J Trop Med Hyg.* 1928;8:507–38.
96. Langeron M TR. Nouvelles méthodes d'étude et assai de classification des champignons levuriformes. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1932;10:1–80.
97. Joachim H and SP. Subacute endocarditis and systemic mycosis (monilia). *JAMA.* 1940;205–8.
98. Fell JW, Meyer SA. Systematics of yeast species in the *Candida parapsilosis* group. *Mycopathol Mycol Appl.* 1967;32(3):177–93.
99. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):606–25.
100. Brillowska-Dabrowska A, Schön T, Pannanusorn S, Lönnbro N, Bernhoff L, Bonnedal J, *et al.* A nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* in southern Sweden verified by genotyping. *Scand J Infect Dis.* 2009;41(2):135–42.
101. Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs BA, Brandt ME, *et al.* Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J Clin Microbiol.* 2004;42(10):4468–72.
102. Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol.* 1992;30(12):3249–54.
103. Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol.* 1995;33(7):1815–21.
104. Nosek J, Tomáška L, Rycovská A, Fukuhara H. Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1283–9.
105. Kato M, Ozeki M, Kikuchi A, Kanbe T. Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida* species. *Gene.* 2001;272(1-2):275–81.
106. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998;73(4):331–71.

107. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol.* 1997;35(5):1216–23.
108. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):284–92.
109. Riccombeni A, Vidanes G, Proux-Wéra E, Wolfe KH, Butler G. Sequence and analysis of the genome of the pathogenic yeast *Candida orthopsilosis*. *PLoS One.* 2012;7(4):e35750.
110. Bertini A, De Bernardis F, Hensgens LAM, Sandini S, Senesi S, Tavanti A. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(2):98–103.
111. Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin DS. Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis sensu lato* species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2739–48.
112. Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(10):2315–22.
113. Blanco-Blanco MT, Gómez-García AC, Hurtado C, Galán-Ladero MA, Lozano MC, García-Tapias A, *et al.* *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: Incidence, epidemiology and antifungal susceptibility. *Rev Iberoam Micol. Revista Iberoamericana de Micología;* 2014;31(2):145–8.
114. Chen Y-C, Lin Y-H, Chen K-W, Lii J, Teng H-J, Li S-Y. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68(3):284–92.
115. Lockhart S, Messer S. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2659–64.
116. Van Asbeck EC, Clemons K V, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol.* 2009;35(4):283–309.
117. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002;50(4):243–60.

118. Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses*. 2001;44(1-2):29–35.
119. Merkerová M, Dostál J, Hradilek M, Pichová I, Hrusková-Heidingsfeldová O. Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. *FEMS Yeast Res*. 2006;6(7):1018–26.
120. Pannanusorn S, Ramírez-Zavala B, Lünsdorf H, Agerberth B, Morschhäuser J, Römling U. Characterization of biofilm formation and the role of BCR1 in clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell*. 2013;14(4):438-51.
121. Singaravelu K, Gácsér A, Nosanchuk JD. Genetic determinants of virulence - *Candida parapsilosis*. *Rev Iberoam Micol*. 2013;31(1):16-21.
122. Song JW, Shin JH, Shint DH, Jung S-I, Cho D, Kee SJ, *et al*. Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Med Mycol*. 2005;43(7):657–61.
123. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet*. 2009;55(5):497–509.
124. Nosek J, Adamíková L, Zemanová J, Tomáska L, Zufferey R, Mamoun C Ben. Genetic manipulation of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet*. 2002;42(1):27–35.
125. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MAS, Sakthikumar S, Munro CA, *et al*. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. 2009;459(7247):657–62.
126. Fundyga RE, Kuykendall RJ, Lee-Yang W, Lott TJ. Evidence for aneuploidy and recombination in the human commensal yeast *Candida parapsilosis*. *Infect Genet Evol*. 2004;4(1):37–43.
127. Kocsubé S, Tóth M, Vágvölgyi C, Dóczi I, Pesti M, Pócsi I, *et al*. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 2):190–5.
128. Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2392–7.
129. Van Asbeck E, Clemons K V, Martinez M, Tong A-J, Stevens DA. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(1):106–9.
130. Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical

- breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic. *J Clin Microbiol.* 2013;51(8):2571–81.
131. Axner-Elings M, Botero-Kleiven S, Jensen RH, Arendrup MC. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* isolates collected during a 1-year period in Sweden. *J Clin Microbiol.* 2011;49(7):2516–21.
  132. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimi. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;69(1):45–50.
  133. Vanhee LME, Nelis HJ, Coenye T. What can be learned from genotyping of fungi? *Med Mycol.* 2010;48 Suppl 1:S60–9.
  134. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. [Use of molecular typing tools for the study of hospital outbreaks of candidemia.]. *Rev Iberoam Micol. Revista Iberoamericana de Micología;* 2013;31(2):97-103.
  135. Van Asbeck EC, Clemons K V, Markham AN, Stevens DA. Molecular epidemiology of the global and temporal diversity of *Candida parapsilosis*. *Scand J Infect Dis.* 2008;40(10):827–34.
  136. Romeo O, Delfino D, Cascio A, Lo Passo C, Amorini M, Romeo D, *et al.* 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.* 2013;13:105–8.
  137. Sabino R, Sampaio P, Rosado L, Stevens DA, Clemons K V, Pais C. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1677–82.
  138. Pulcrano G, Roschetto E, Iula VD, Panellis D, Rossano F, Catania MR. MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(11):2919–28.
  139. Cortés L JA, Russi N JA. [Echinocandins]. *Rev Chilena Infectol.* 2011;28(6):529–36.
  140. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(2):112–22.
  141. Walker LA, Gow NAR, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol.* 2010;47(2):117–26.
  142. Pérez P, García-Acha I DA. Effect of papulacandin B on the cell wall and growth of *Geotrichum lactis*. *J Gen Microbiol.* 1981;129:245–50.

143. Radding JA, Heidler SA, Turner WW. Photoaffinity analog of the semisynthetic echinocandin LY303366: identification of echinocandin targets in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(5):1187–94.
144. Sawistowska-Schröder ET, Kerridge D, Perry H. Echinocandin inhibition of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Candida albicans*. *FEBS Lett*. 1984;173(1):134–8.
145. Taft CS, Stark T, Selitrennikoff CP. Cilofungin (LY121019) inhibits *Candida albicans* (1-3)-beta-D-glucan synthase activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(12):1901–3.
146. Tang J, Parr TR. W-1 solubilization and kinetics of inhibition by cilofungin of *Candida albicans* (1,3)-beta-D-glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(1):99–103.
147. DiDone L, Oga D, Krysan DJ. A novel assay of biofilm antifungal activity reveals that amphotericin B and caspofungin lyse *Candida albicans* cells in biofilms. *Yeast*. 2011;28(8):561–8.
148. Beyda ND, Lewis RE, Garey KW. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *Ann Pharmacother*. 2012;46(7-8):1086–96.
149. Stefano P, Bachmann, Thomas F, Patterson and JLL-R. In vitro activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2228–30.
150. Chen SC-A, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs*. 2011;71(1):11–41.
151. Johnson M, Edlind T. Topological and mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae Fks1*. *Eukaryot Cell*. 2012;11(7):952–60.
152. Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat*. 2007;10(3):121–30.
153. Antony Bacic, Geoffrey B. Fincher BAS. *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides* (Google eBook). Academic Press; 2009.
154. Mio T, Adachi-Shimizu M, Tachibana Y, Tabuchi H, Inoue SB, Yabe T, *et al*. Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae GSC1/FKS1* and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol*. 1997;179(13):4096–105.
155. Kondoh O, Tachibana Y, Ohya Y, Arisawa M, Watanabe T. Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol*. 1997;179(24):7734–41.

156. Mazur P, Morin N, Baginsky W, El-Sherbeini M, Clemas JA, Nielsen JB, *et al.* Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol.* 1995;15(10):5671–81.
157. Ishihara S, Hirata A, Nogami S, Beauvais A, Latge J-P, Ohya Y. Homologous subunits of 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 2007;6(2):143–56.
158. Kurtz MB, Abruzzo G, Flattery A, Bartizal K, Marrinan JA, Li W, *et al.* Characterization of echinocandin-resistant mutants of *Candida albicans*: genetic, biochemical, and virulence studies. *Infect Immun.* 1996;64(8):3244–51.
159. Park S, Kelly R, Kahn J. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(8):3264–73.
160. Ben-Ami R, Garcia-Effron G, Lewis RE, Gamarra S, Leventakos K, Perlin DS, *et al.* Fitness and virulence costs of *Candida albicans* *FKS1* hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *J Infect Dis.* 2011;204(4):626–35.
161. Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Raoux D, Hoinard D, Dromer F, Dannaoui E. 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.* 2008;52(9):3092–8.
162. Castanheira M, Woosley LN, Messer SA, Diekema DJ, Jones RN, Pfaller MA. Frequency of *fks* Mutations among *Candida glabrata* Isolates from a 10-Year Global Collection of Bloodstream Infection Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):577–80.
163. Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2305–12.
164. Castanheira M, Woosley LN, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN, Pfaller MA. Low prevalence of *fks1* hot spot 1 mutations in a worldwide collection of *Candida* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(6):2655–9.
165. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Kwa AL, Cheng S, Du C, *et al.* 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.* 2012;56(9):4862–9.
166. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, *et al.* Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis.* 2013;56(12):1724–32.

167. Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones RN. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1199–203.
168. Schuetzer-Muehlbauer M, Willinger B, Krapf G, Enzinger S, Presterl E, Kuchler K. The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol Microbiol*. 2003;48(1):225–35.
169. Niimi K, Maki K, Ikeda F. Overexpression of *Candida albicans* *CDR1*, *CDR2*, or *MDR1* does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(4):1148–55.
170. Munro C a. Fungal echinocandin resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(2):115–6.
171. Munro CA, Selvaggini S, de Bruijn I, Walker L, Lenardon MD, Gerssen B, *et al*. The PKC, HOG and Ca<sup>2+</sup> signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2007;63(5):1399–413.
172. Walker LA, Munro CA, de Bruijn I, Lenardon MD, McKinnon A, Gow NAR. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog*. 2008;4(4):e1000040.
173. Plaine A, Walker L, Da Costa G, Mora-Montes HM, McKinnon A, Gow NAR, *et al*. Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genet Biol*. 2008;45(10):1404–14.
174. Lee KK, Maccallum DM, Jacobsen MD, Walker LA, Odds FC, Gow NAR, *et al*. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):208–17.
175. Walker LA, Gow NAR, Munro CA. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):146–54.
176. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 1990;315–22.
177. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat*. 2010;13(6):180–95.
178. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, *et al*. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat*. 2011;14(3):164–76.

179. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, *et al.* Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for posaconazole and voriconazole and *Candida* spp. as determined by 24-hour CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):630–7.
180. Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Alexander BD, *et al.* Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(3):330–43.
181. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema DJ, *et al.* Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):2040–6.
182. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Fourth informational supplement M27-S4. Clin Lab Stand Institute, Wayne, PA. 2012.
183. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Third informational Supplement M27-S3. Clin Lab Stand Institute, Wayne, PA. 2008.
184. Pemán J, Cantón E, Miñana JJC, Florez JA, Echeverria J, Ortega DN, *et al.* Variación de la epidemiología de las fungemias y de la sensibilidad al fluconazol de los aislamientos de hemocultivos en los últimos 10 años en España: resultados del estudio FUNGEMYCA. *Rev Iberoam Micol.* 2011;28(2):91–9.
185. Thompson GR, Wiederhold NP, Vallor AC, Villareal NC, Lewis JS, Patterson TF. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(10):3783–5.
186. Cuenca-Estrella M, Rodriguez D, Almirante B, Morgan J, Planes AM, Almela M, *et al.* In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002-2003. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(2):194–9.
187. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):133–63.
188. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 Suppl 6:5-10.
189. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, *et al.* Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(7):1149–55.

190. Guinea J, Zaragoza Ó, Escribano P, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Sánchez-Reus F, *et al.* Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1529–37.
191. Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, *et al.* Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(12):5590–6.
192. De Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis complex* isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(3):418–24.
193. Tavanti A, Hensgens LAM, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* Clinical Isolates by Amplification Fragment Length Polymorphism Reveals Genetic Diversity among Independent Isolates and Strain Maintenance within Patients. *J Clin Microbiol.*;45(5):1455–62.
194. Nieto MC, Tellería O, Cisterna R. Sentinel surveillance of invasive candidiasis in Spain: epidemiology and antifungal susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;81(1):34–40.
195. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Sánchez C, Muñoz P, Bouza E, Guinea J. Antifungal resistance to fluconazole and echinocandins is not emerging in yeast isolates causing fungemia in a Spanish tertiary care center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4565–72.
196. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, *et al.* Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):842–9.
197. Gomez-Lopez a, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, *et al.* Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1506–9.
198. Fernández-Ruiz M, Aguado JM, Almirante B, Lora-Pablos D, Padilla B, Puig-Asensio M, *et al.* Initial use of echinocandins does not negatively influence outcome in *Candida parapsilosis* bloodstream infection: a propensity score analysis. *Clin Infect Dis.* 2014;58(10):1413–21.
199. Treviño-Rangel RDJ, Garza-González E, González JG, Bocanegra-García V, Llaca JM, González GM. Molecular characterization and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis species complex* of clinical isolates from Monterrey, Mexico. *Med Mycol.* 2012;50(7):781–4.

200. Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, Bonfietti LX, Bustamante B, Canton E, *et al.* Interlaboratory variability of Caspofungin MICs for *Candida* spp. Using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent? *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(12):5836–42.
201. Rodriguez-Tudela JL. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(4):398–405.
202. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Castanheira M. Use of anidulafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 4,290 clinical isolates of *Candida* by using CLSI methods and interpretive criteria. *J Clin Microbiol.* 2014;52(9):3223–9.
203. Pfeiffer CD, Garcia-Effron G, Zaas AK, Perfect JR, Perlin DS, Alexander BD. Breakthrough invasive candidiasis in patients on micafungin. *J Clin Microbiol.* 2010;48(7):2373–80.
204. Dannaoui E, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Grenouillet F, Cassaing S, Baixench M-T, *et al.* *Candida* spp. with acquired echinocandin resistance, France, 2004-2010. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(1):86–90.
205. Garcia-Effron G, Chua DJ, Tomada JR, DiPersio J, Perlin DS, Ghannoum M, *et al.* Novel FKS mutations associated with echinocandin resistance in *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):2225–7.
206. Ghannoum M a, Chen A, Buhari M, Chandra J, Mukherjee PK, Baxa D, *et al.* Differential in vitro activity of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* isolates recovered from a burn unit. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(3):274–9.
207. Glöckner A, Cornely OA. [Invasive candidiasis in non-neutropenic adults : Guideline-based management in the intensive care unit]. *Anaesthesist.* 2013;62(12):1003–9.
208. Cuenca Estrella M. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect;* 2012; 18(suppl 7): 9-18.
209. Yalaz M, Akisu M, Hilmioglu S, Calkavur S, Cakmak B, Kultursay N. Successful caspofungin treatment of multidrug resistant *Candida parapsilosis* septicaemia in an extremely low birth weight neonate. *Mycoses.* 2006;49(3):242–5.
210. Jensen RH, Justesen US, Rewes A, Perlin DS, Arendrup MC. Echinocandin failure case due to a yet unreported *FKSI* mutation in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(6):3550–2.
211. Johnson ME, Katiyar SK, Edlind TD. New Fks hot spot for acquired echinocandin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its contribution to

- intrinsic resistance of *Scedosporium* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(8):3774–81.
212. Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of *fks1* mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):112–22.
213. Pham CD, Bolden CB, Kuykendall RJ, Lockhart SR. Development of a Luminex-based multiplex assay for detection of mutations conferring resistance to Echinocandins in *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(3):790–5.
214. Beyda ND, John J, Kilic A, Alam MJ, Lasco TM, Garey KW. *FKS* mutant *Candida glabrata*: risk factors and outcomes in patients with candidemia. *Clin Infect Dis.* 2014;59(6):819–25.
215. Zimbeck AJ, Iqbal N, Ahlquist AM, Farley MM, Harrison LH, Chiller T, *et al.* *FKS* mutations and elevated echinocandin MIC values among *Candida glabrata* isolates from U.S. population-based surveillance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):5042–7.
216. Fekkar a, Dannaoui E, Meyer I, Imbert S, Brossas JY, Uzunov M, *et al.* Emergence of echinocandin-resistant *Candida* spp. in a hospital setting: a consequence of 10 years of increasing use of antifungal therapy? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(9):1489-96.
217. Arendrup MC, Garcia-Effron G, Lass-Flörl C, Lopez AG, Rodriguez-Tudela J-L, Cuenca-Estrella M, *et al.* Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):426–39.
218. Arendrup MC, Perlin DS. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? *Curr Opin Infect Dis.* 2014;27(6):484–92.
219. Cordeiro R de A, Macedo R de B, Teixeira CEC, Marques FJ de F, Bandeira T de JPG, Moreira JLB, *et al.* The calcineurin inhibitor cyclosporin A exhibits synergism with antifungals against *Candida parapsilosis* species complex. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 7):936–44.
220. Shinde RB, Chauhan NM, Raut JS, Karuppayil SM. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11:27.
221. Steinbach WJ, Cramer RA, Perfect BZ, Henn C, Nielsen K, Heitman J, *et al.* Calcineurin inhibition or mutation enhances cell wall inhibitors against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(8):2979–81.
222. Singh-Babak SD, Babak T, Diezmann S, Hill J a, Xie JL, Chen Y-L, *et al.* Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. *PLoS Pathog.* 2012;8(5):e1002718.

223. Del Poeta M, Cruz MC, Cardenas ME, Perfect JR, Heitman J. Synergistic antifungal activities of bafilomycin A(1), fluconazole, and the pneumocandin MK-0991/caspofungin acetate (L-743,873) with calcineurin inhibitors FK506 and L-685,818 against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3):739–46.
224. Viviani MA, Cogliati M, Esposto MC, Prigitano A, Tortorano AM. Four-year persistence of a single *Candida albicans* genotype causing bloodstream infections in a surgical ward proven by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2006;44(1):218–21.
225. Wu Y, Zhou H-J, Che J, Li W-G, Bian F-N, Yu S-B, *et al*. Multilocus microsatellite markers for molecular typing of *Candida tropicalis* isolates. *BMC Microbiol*. 2014;14(1):245.
226. Ghawar W, Attia H, Bettaieb J, Yazidi R, Laouini D, Salah A Ben. Genotype profile of *Leishmania* major strains isolated from tunisian rodent reservoir hosts revealed by multilocus microsatellite typing. *PLoS One*. 2014;9(9):e107043.
227. Parobek CM, Jiang LY, Patel JC, Alvarez-Martínez MJ, Miro JM, Worodria W, *et al*. Multilocus microsatellite genotyping array for investigation of genetic epidemiology of *Pneumocystis jirovecii*. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1391–9.
228. Hadrich I, Neji S, Drira I, Trabelsi H, Mahfoud N, Ranque S, *et al*. Microsatellite typing of *Aspergillus flavus* in patients with various clinical presentations of aspergillosis. *Med Mycol*. 2013;51(6):586–91.
229. Gauthier M, Bidault F, Mosnier A, Bablishvili N, Tukvadze N, Somphavong S, *et al*. High-throughput MIRU-VNTR genotyping for *Mycobacterium tuberculosis* epidemiological studies. *J Clin Microbiol*. 2015;53(2):498-503.
230. De Valk HA, Meis JFGM, Klaassen CHW. Microsatellite based typing of *Aspergillus fumigatus*: strengths, pitfalls and solutions. *J Microbiol Methods*. 2007;69(2):268–72.
231. Delfino D, Scordino F. Potential association of specific *Candida parapsilosis* genotypes, bloodstream infections and colonization of health workers' hands. *Clin Microbiol Infect*. 2014;1–6.
232. De Valk HA, Meis JFGM, Bretagne S, Costa J-M, Lasker BA, Balajee SA, *et al*. Interlaboratory reproducibility of a microsatellite-based typing assay for *Aspergillus fumigatus* through the use of allelic ladders: proof of concept. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(2):180–7.
233. Katiyar S, Pfaller M, Edlind T. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2892–4.
234. Garcia-Effron G, Kontoyiannis DP, Lewis RE, Perlin DS. Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk

for hematologic malignancies. Antimicrob Agents Chemother.  
2008;52(11):4181-3.



## **8. ANEXO I: COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

---



## 8.1. Fungemia in a Spanish hospital: the role of *Candida parapsilosis* over a 15-year period

Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2014; 46: 454–461

informa  
healthcare

### ORIGINAL ARTICLE

## Fungemia in a Spanish hospital: the role of *Candida parapsilosis* over a 15-year period

MAR MARTÍ-CARRIZOSA<sup>1,2,3</sup>, FERRAN SÁNCHEZ-REUS<sup>1,2,3</sup>,  
FRANCESCA MARCH<sup>1,2</sup> & PERE COLL<sup>1,2,3</sup>

From the <sup>1</sup>Serví de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, <sup>2</sup>Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), and <sup>3</sup>Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

### Abstract

**Background:** *Candida parapsilosis* is one of the main causes of fungemia in tertiary-care hospitals. Few studies have analysed the changes in its distribution over a long period. We compared the distribution of *C. parapsilosis* with that of other fungi over a 15-y period in a tertiary hospital. **Methods:** The susceptibility of *C. parapsilosis* was analysed using the new species-specific clinical breakpoints. The *C. parapsilosis* complex species were differentiated molecularly. **Results:** From January 1997 to December 2011, 360 isolates causing 350 episodes of fungemia were isolated. *C. parapsilosis* was the second most frequently isolated species (20%); only 1 *C. orthopsilosis* was identified and there were no *C. metapsilosis*. The remaining episodes were caused by *C. albicans* (43.1%), *C. tropicalis* (14.4%), *C. glabrata* (11.7%), and other fungal species (10.8%). The incidence of candidemia increased more than two-fold between 2009 and 2011 (from 3.3 to 7.4 cases/100,000 population), and *C. parapsilosis* and *C. glabrata* fungemia increased throughout the period. *C. parapsilosis* was the most frequent species in children under 15 y (57.1%). All *C. parapsilosis* isolates were susceptible to anidulafungin, micafungin, flucytosine, amphotericin B, and posaconazole, while 98.5% were susceptible to caspofungin, 97.1% to voriconazole, 95.6% to fluconazole, and 76.5% to itraconazole. **Conclusions:** This long-term study showed a slight increase in the incidence of candidemia during the years of the study and a trend towards an increase in *C. parapsilosis*. Because of its high frequency and intrinsic low susceptibility to echinocandins, the prevalence and susceptibility of *C. parapsilosis* should be monitored, especially in children.

**Keywords:** Antifungal susceptibility, candidemia, *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, fungemia

### Introduction

Fungemia is a serious health problem worldwide due to its high morbidity and mortality rates [1]. Furthermore, the frequency has increased in recent years, particularly for non-*Candida albicans* species [2]. *C. albicans* is still the most common cause of fungemia, but its frequency appears to be decreasing in some countries [3,4]. Knowledge of such changes in species distribution is of fundamental importance for the treatment of fungemia because some species have a low susceptibility to certain antifungal drugs, such as *C. glabrata* to fluconazole and *C. parapsilosis* to echinocandins. These 2 antifungal drugs are commonly used as first-line agents for prophylaxis,

empiric therapy, pre-emptive therapy, and targeted treatment, taking into account the clinical and epidemiological situation [5–8].

In several regions of the world, such as Mexico, Argentina, Spain, Italy, and Turkey, *C. parapsilosis* is now the second most commonly isolated species in fungemia [3,9–12]. Moreover, *C. parapsilosis* has recently been considered a 3-species complex, consisting of *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* [13]. These 3 species show significant differences in their susceptibility patterns and prevalence rates [14]. However, little is known of their distribution and susceptibility patterns over the years. Data are also lacking regarding the current

Correspondence: F. Sánchez-Reus, Serví de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 89 Sant Quintí Street, 08026 Barcelona, Spain. Tel: +34 935537291. Fax: +34 935537287. E-mail: fsanchezr@santpau.cat

(Received 21 November 2013; accepted 25 February 2014)

ISSN 0036-5548 print/ISSN 1651-1980 online © 2014 Informa Healthcare  
DOI: 10.3109/00365548.2014.900190

RIGHTS LINK

epidemiology of *C. albicans* and non-*C. albicans* species, as few studies have been performed over a long period of time in recent years.

We performed a retrospective study over a 15-y period at a tertiary university hospital in Barcelona, Spain. We evaluated the distribution and evolution of *C. parapsilosis* versus other species causing fungemia and also the prevalence of the 3 species of the *C. parapsilosis* complex and their susceptibilities to the 9 most commonly used antifungal agents.

## Materials and methods

### Data collection

All episodes of fungemia detected in patients hospitalized between January 1997 and December 2011 in the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona, were included in the study. This hospital served a population of approximately 420,000 inhabitants throughout the study period, representing 25% of the population of Barcelona. A fungemia episode was defined as a positive blood culture for yeast or mould. We considered fungemia to be a single episode when 2 positive blood cultures of the same species were separated by less than 30 days. We considered fungemia to be 2 separate episodes when 2 different fungal species were separated by more than 3 days.

### Blood cultures and identification of isolates

The semiautomatic system BacT/Alert was used to detect septicaemia. Positive blood cultures with microscopically observed yeasts or moulds were subcultured on Sabouraud dextrose agar (Oxoid, Madrid, Spain), blood agar (Oxoid, Madrid, Spain), or CHROMagar Candida agar (CHROMagar, Paris, France). Cultures were incubated at 37°C for 24–48 h and the colonies were examined macroscopically and microscopically. Yeasts were identified using commercial kits (VITEK 2YST, API ID 32C, or API 20C AUX) as per the manufacturer's instructions. One isolate from each episode of *C. parapsilosis* fungemia was recovered from the lyophilized strain collection stored in the mycology laboratory. The lyophilized strains were rehydrated and tested for purity and viability by culturing on CHROMagar Candida (CHROMagar, Paris, France) and on Sabouraud dextrose agar.

### Molecular identification of cryptic species from *C. parapsilosis* complex

To identify the cryptic species of *C. parapsilosis* complex – *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* – molecular identification was performed by amplifying and

sequencing the DNA segments comprising the internal transcribed spacer 1 (ITS1) and ITS2 [13].

### Susceptibility testing

Susceptibility testing was performed on all *C. parapsilosis* complex isolates using the Sensititre YeastOne SYO-10 colorimetric antifungal panel (Trek Diagnostic Systems, UK), which includes the following 9 antifungal agents: anidulafungin (AFG), micafungin (MFG), caspofungin (CFG), flucytosine (5FC), posaconazole (POS), voriconazole (VRC), itraconazole (ITC), fluconazole (FLC), and amphotericin B (AMB). The minimum inhibitory concentrations (MICs) for the 9 antifungal agents tested were read after 24 h of incubation, as recommended by manufacturer. For the interpretative criteria, we used the new species-specific clinical breakpoints and the epidemiological cut-off values proposed by Pfaller et al., in which the isolates showing a MIC  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  for AFG, CFG, MFG, and FLC, a MIC  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$  for 5FC, a MIC  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$  for POS and AMB, and a MIC  $\leq 0.12$   $\mu\text{g/ml}$  for VRC and ITC, were classified as susceptible strains [15–20]. *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were used as quality control strains, as recommended in the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.

### Statistical analyses

The Chi-square test and Fisher's exact test were used to detect differences in gender, patient age, and species distribution by year. Differences in antifungal MICs over the years were examined by Kruskal–Wallis test followed by the Mann–Whitney test. In all cases, alpha was set at 0.05.

## Results

### Distribution of species causing fungemia

Over the 15-y study period, 360 isolates were collected from 350 episodes of proven fungemia in 343 patients, 7 of whom had 2 different episodes. Table I shows the species distribution over the 15-y period. The most common species isolated from blood cultures was *C. albicans* (155 cases; 43.1%), followed by *C. parapsilosis* (72 cases; 20.0%), *C. tropicalis* (52 cases; 14.4%), *C. glabrata* (42 cases; 11.7%), *C. lusitanae* (5 cases; 1.4%), and *C. krusei* (4 cases; 1.1%). Six episodes (1.7%) of fungemia were caused by unusual *Candida* spp. (1 *C. rugosa*, 1 *C. guilliermondii*, 1 *C. dubliniensis*, 1 *C. lipolytica*, and 2 *C. kefyr*). *Candida* species accounted for

Scand J Infect Dis Downloaded from informahealthcare.com by Universitat de Barcelona on 07/04/14  
For personal use only.

Table I. Species distribution of 360 bloodstream isolates causing fungemia in the 343 patients admitted to the Hospital de la Santa Creu i de San Pau.

| Species isolated                         | Y, number of isolates (%) |           |          |           |           |          |          |           |           |           |          |           |          |          | Total    |            |
|--|---------------------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|----------|------------|
|  | 1997                      | 1998      | 1999     | 2000      | 2001      | 2002     | 2003     | 2004      | 2005      | 2006      | 2007     | 2008      | 2009     | 2010     |          | 2011       |
| <i>C. albicans</i>                       | 6 (33.3)                  | 16 (51.6) | 7 (43.8) | 10 (52.6) | 14 (53.8) | 9 (37.5) | 9 (37.5) | 12 (42.9) | 13 (48.1) | 11 (36.7) | 9 (36)   | 10 (43.5) | 6 (37.5) | 7 (33.3) | 16 (50)  | 155 (43.1) |
| <i>C. parapsitosis</i>                   | 2 (11.1)                  | 5 (16.1)  | 4 (25)   | 5 (26.3)  | 4 (15.4)  | 3 (12.5) | 7 (29.2) | 5 (17.9)  | 6 (22.2)  | 7 (23.3)  | 6 (24)   | 2 (8.7)   | 4 (25)   | 5 (23.8) | 7 (21.9) | 72 (20)    |
| <i>C. tropicalis</i>                     | 3 (16.7)                  | 7 (22.6)  | 4 (25)   | 1 (5.3)   | 3 (11.5)  | 3 (12.5) | 5 (20.8) | 2 (7.1)   | 4 (14.8)  | 5 (16.7)  | 4 (16)   | 6 (26.1)  | 1 (6.3)  | 1 (4.8)  | 3 (9.4)  | 52 (14.4)  |
| <i>C. glabrata</i>                       | 3 (16.7)                  | 1 (3.2)   | 1 (6.3)  | 3 (15.8)  | 2 (7.7)   | 3 (12.5) | 2 (8.3)  | 7 (25)    | 3 (10)    | 3 (10)    | 4 (16)   | 3 (13)    | 3 (18.8) | 3 (14.3) | 4 (12.5) | 42 (11.7)  |
| <i>C. lusitanae</i>                      |                           |           |          |           |           | 1 (4.2)  |          |           | 2 (7.4)   | 1 (3.3)   |          |           |          | 1 (4.8)  |          | 5 (1.4)    |
| <i>C. krusei</i>                         |                           |           |          |           |           |          |          |           |           |           |          |           |          |          |          | 4 (1.1)    |
| Other                                    | 2 (11.1)                  | 1 (3.2)   |          |           |           | 1 (4.2)  |          | 1 (3.6)   |           | 1 (3.3)   |          | 1 (4.3)   | 1 (6.3)  | 1 (4.8)  | 1 (3.1)  | 6 (1.7)    |
| <i>Candida</i> spp. <sup>a</sup>         |                           |           |          |           |           |          |          |           |           |           |          |           |          |          |          |            |
| non- <i>Candida</i> spp. <sup>b</sup>    | 2 (11.1)                  | 1 (3.2)   |          |           | 3 (11.5)  | 4 (16.7) | 1 (4.2)  | 1 (3.6)   | 2 (7.4)   | 1 (3.3)   | 2 (8)    | 1 (4.3)   | 1 (6.3)  | 2 (9.5)  |          | 21 (5.8)   |
| Dimorphic/filamentous fungi <sup>c</sup> |                           |           |          |           |           |          |          |           |           | 1 (3.3)   |          |           |          | 1 (4.8)  | 1 (3.1)  | 3 (0.8)    |
| Total                                    | 18 (5.0)                  | 31 (8.6)  | 16 (4.4) | 19 (5.3)  | 26 (7.2)  | 24 (6.7) | 24 (6.7) | 28 (7.8)  | 27 (7.5)  | 30 (8.3)  | 25 (6.9) | 23 (6.4)  | 16 (4.4) | 21 (5.8) | 32 (8.9) | 360 (100)  |
| Mixed fungemia                           |                           |           |          | 1         |           | 1        | 2        |           | 2         | 2         | 1        | 1         | 1        |          |          | 10 (2.9)   |

<sup>a</sup>Other *Candida* spp. were as follows: *C. rugosa* (1 isolate), *C. guilliermondii* (1 isolate), *C. dubliniensis* (1 isolate), *C. lipolytica* (1 isolate), *C. kefyr* (2 isolates).

<sup>b</sup>Other non-*Candida* spp. were as follows: *Rhodotorula* spp. (1 isolate), *Trichosporon beigeli* (1 isolate), *Hansenula anomala* (1 isolate), *Blastoschizomyces capitatus* (5 isolates), *Cryptococcus neoformans* (13 isolates).

<sup>c</sup>Dimorphic/filamentous fungi spp. were as follows: *Histoplasma capsulatum* (1 isolate), *Penicillium marneffei* (1 isolate), *Fusarium* spp. (1 isolate).

93.4% of all isolates (336 cases), while other yeasts accounted for 5.8% (1 *Rhodotorula* spp., 1 *Trichosporon beigeli*, 1 *Hansenula anomala*, 5 *Blastoschizomyces capitatus*, and 13 *Cryptococcus neoformans*); dimorphic or filamentous fungi accounted for the remaining 0.8% (1 *Histoplasma capsulatum*, 1 *Penicillium marneffei*, and 1 *Fusarium* spp.). Although almost all episodes of fungemia were caused by a single species of fungus, a mixed fungemia was detected in 10 cases (2.9%): *C. albicans* + *C. glabrata* (5 episodes; 50.0%), *C. albicans* + *C. parapsilosis* (3 episodes; 30.0%), *C. albicans* + *C. tropicalis* (1 episode; 10.0%), and *C. lusitaniae* + *B. capitatus* (1 episode; 10.0%).

The number of candidemia episodes changed over the 15-y study period. Between 1997 and 2005, the incidence of candidemia episodes showed the expected, slight, year-to-year variations. However, the incidence of 6.2 cases of candidemia/100,000 population in 2006 decreased to 5.2 cases/100,000 population in 2007, to 5.0 cases/100,000 population in 2008, and to 3.3 cases/100,000 population in 2009. In 2010 the incidence of candidemia increased to 4.3 cases/100,000 population and in 2011 it was as high as 7.4 cases/100,000 population, the year with the highest incidence rates. These differences did not reach statistical significance ( $p=0.294$ ), however the incidence of candidemia tended towards an increase at an average of 0.05 cases/100,000 population by year of the study.

*C. albicans* was the species most frequently isolated in all study years. However, 2 periods were differentiated with regard to its frequency ( $p=0.001$ ). In the first period, from 1998 to 2001, 50% of the fungemia cases involved *C. albicans*, while in the second period, from 2002 to 2010, only around 40% of fungemia involved *C. albicans*. *C. parapsilosis* was identified as the second most common species causing fungemia throughout the study period except for

3 y (1997, 1998, and 2008), with a percentage ranging from 8.7% in 2008 to 29.2% in 2003. Although the differences in distribution of *C. parapsilosis* over the years did not reach statistical significance ( $p=0.738$ ), the prevalence of this species tended towards an increase at an average of 0.33% by year. The frequency of *C. tropicalis* and *C. glabrata* also fluctuated during the study period, ranging from 4.8% in 2010 to 26.1% in 2008 and from 0% in 2005 to 25% in 2004, respectively. From 2009 to 2011, the prevalence of *C. tropicalis* was lower than in the previous years of the study. This reduction was related to an increase in frequency of *C. glabrata*, which had percentages higher than those obtained for *C. tropicalis* in these last 3 y of the study ( $p=0.09$ ).

#### Demographic data of patients infected by *Candida* spp.

Table II shows the distribution of *Candida* species according to patient age. There were significant differences in frequency in some species between the 4 age groups. The number of candidemia episodes caused by *C. parapsilosis* varied significantly between the 4 age groups ( $p<0.001$ ). In the age groups of  $\leq 1$  y (66.7%) and 2–14 y (50%) it was the most frequently isolated species, but in the other 2 age groups it was significantly less frequent, showing 13.2% for the 15–64 y age group and 15.1% for the  $\geq 65$  y group. *C. albicans* was the second most frequently isolated species in the age groups of  $\leq 1$  and 2–14 y, representing 29.2% and 37.5% cases of candidemia, respectively. In the other 2 groups it was the most frequently isolated species, with 43.9% of cases in the 15–64 age group and 51.8% in the  $\geq 65$  y age group, followed by *C. tropicalis* representing 20.2% and 16.3%, respectively. The difference in percentages between *C. albicans* and *C. parapsilosis* was more notable in the age group  $\leq 1$  y. Only 1

Table II. *Candida* species distribution by age group.

| Species of <i>Candida</i>              | $\leq 1$ y         |                | 2–14 y             |                | 15–64 y            |                | $\geq 65$ y        |                | Total |
|--|--------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|-------|
|  | Number of isolates | % <sup>a</sup> |       |
| <i>C. albicans</i>                     | 7                  | 29.2           | 12                 | 37.5           | 50                 | 43.9           | 86                 | 51.8           | 155   |
| <i>C. parapsilosis</i>                 | 16                 | 66.7           | 16                 | 50.0           | 15                 | 13.2           | 25                 | 15.1           | 72    |
| <i>C. tropicalis</i>                   | 1                  | 4.2            | 1                  | 3.1            | 23                 | 20.2           | 27                 | 16.3           | 52    |
| <i>C. glabrata</i>                     | 0                  | 0.0            | 1                  | 3.1            | 17                 | 14.9           | 24                 | 14.5           | 42    |
| <i>C. lusitaniae</i>                   | 0                  | 0.0            | 0                  | 0.0            | 3                  | 2.6            | 2                  | 1.2            | 5     |
| <i>C. krusei</i>                       | 0                  | 0.0            | 1                  | 3.1            | 3                  | 2.6            | 0                  | 0.0            | 4     |
| Other <i>Candida</i> spp. <sup>b</sup> | 0                  | 0.0            | 1                  | 3.1            | 3                  | 2.6            | 2                  | 1.2            | 6     |
| Total                                  | 24                 | 7.1            | 32                 | 9.5            | 114                | 33.9           | 166                | 49.4           | 336   |

<sup>a</sup>Percentage of isolates in the indicated age group.

<sup>b</sup>Other *Candida* spp. were as follows: *C. rugosa* (1 isolate), *C. guilliermondii* (1 isolate), *C. dubliniensis* (1 isolate), *C. lipolytica* (1 isolate), *C. kefyr* (2 isolates).

other species was detected in this group: 1 case of *C. tropicalis*. *C. tropicalis* was the third most common agent isolated in all age groups. *C. glabrata* also showed differences in frequency in the 4 age groups, increasing in parallel with age ( $p < 0.001$ ). Analysis of candidemia episodes in relation to gender showed a higher frequency in males (62.8%) than in females (37.2%) ( $p < 0.001$ ).

#### Molecular identification of *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*

Molecular identification was possible in 68 of the 72 *C. parapsilosis* isolates. Four isolates could not be identified molecularly because of failure to grow when subcultured. Only 1 of the isolates was identified as *C. orthopsilosis* (1.5%) and all other strains were identified as *C. parapsilosis sensu stricto* (98.5%). The total prevalence of *C. orthopsilosis* causing fungemia was 0.3%, corresponding to a single strain isolated in a 37-y-old male in 2008.

#### Antifungal susceptibility testing of *C. parapsilosis*

Table III summarizes the results of in vitro antifungal susceptibility testing of the 68 *C. parapsilosis* isolates to 9 antifungal agents. According to the new species-specific clinical breakpoints and the epidemiological cut-off values, 100% of *C. parapsilosis* isolates were susceptible to AFG, MFG, 5FC, AMB, and POS. The percentages of susceptible isolates for CFG, VRC, FLC, and ITC were 98.5%, 97.1%, 95.6%, and 76.5%, respectively. Three strains were resistant to FLC ( $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ ). Of these, 2 were also susceptible dose-dependent (SDD) to VRC (0.25–0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) and the third was also SDD to ITC (0.25–0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) and had an intermediate susceptibility to CFG

(4  $\mu\text{g/ml}$ ). Another 15 isolates were SDD to ITC ( $\text{MIC}_{90}$  0.25  $\mu\text{g/ml}$ ). The only *C. orthopsilosis* isolate was susceptible to all antifungal agents.

When susceptibility of isolates was compared between the 4 age groups, no significant differences were observed in the geometric mean (GM) MIC values for all antifungal agents tested. However, 2 of the isolates resistant to FLC and 4 SDD isolates to ITC were identified in patients less than 15 y old.

The GM MIC, the  $\text{MIC}_{50}$ , and the  $\text{MIC}_{90}$  values for CFG (0.41, 0.5, and 1, respectively) were lower than those for MFG (1.18, 1, and 2, respectively) and AFG (1.06, 1, and 2, respectively). The GM MIC values remained stable throughout the study period for all the antifungal agents studied.

#### Discussion

In this survey we analysed the frequency and the evolution of *C. parapsilosis* complex versus other fungal species causing fungemia over a 15-y period (1997–2011). The importance of *C. parapsilosis* as an agent of fungemia is increasing due to its high frequency, particularly in paediatric patients, as corroborated by our findings. *C. parapsilosis* (20%) was the second most frequently isolated species causing fungemia in almost all of the study years, after *C. albicans* (43.1%), which was the most common species isolated during the study period. The remaining fungemia episodes were caused by *C. tropicalis* (14.4%), *C. glabrata* (11.7%), *C. lusitanae* (1.4%), *C. krusei* (1.1%), and other fungi (8.3%). The distribution of the fungal species causing fungemia in our centre and the frequency reported for *C. parapsilosis* are similar to those documented in other recent reports in Spain [10,21–26], Mexico [3], Argentina [9], Italy [11], and Turkey [12]. In

Table III. Results of the in vitro susceptibility testing of the 68 *Candida parapsilosis* complex isolates to 9 antifungal agents.

| Drug           | GM MIC, $\mu\text{g/ml}$ | MIC range   | $\text{MIC}_{50}$ | $\text{MIC}_{90}$ | Percentage of susceptible isolates <sup>a</sup> |
|----------------|--------------------------|-------------|-------------------|-------------------|---|
| Anidulafungin  | 1.06                     | 0.25–2      | 1                 | 2                 | 100   |
| Micafungin     | 1.18                     | 0.125–2     | 1                 | 2                 | 100   |
| Caspofungin    | 0.41                     | 0.06–4      | 0.5               | 1                 | 98.5  |
| Flucytosine    | 0.07                     | <0.06–0.5   | <0.06             | 0.125             | 100   |
| Amphotericin B | 0.04                     | 0.016–0.5   | 0.016             | 0.25              | 100   |
| Posaconazole   | 0.05                     | 0.008–0.25  | 0.06              | 0.125             | 100   |
| Voriconazole   | 0.01                     | <0.008–0.25 | 0.016             | 0.03              | 97.1  |
| Itraconazole   | 0.10                     | 0.016–0.5   | 0.125             | 0.25              | 76.5  |
| Fluconazole    | 1.00                     | 0.025–32    | 1                 | 2                 | 95.6  |

MIC, minimum inhibitory concentration; GM MIC, geometric mean MIC.

<sup>a</sup>Susceptibility breakpoints were as follows: the anidulafungin MIC was  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ , the micafungin MIC was  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ , the caspofungin MIC was  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ , the flucytosine MIC was  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ , the amphotericin B MIC was  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ , the posaconazole MIC was  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ , the voriconazole MIC was  $\leq 0.12 \mu\text{g/ml}$ , the itraconazole MIC was  $\leq 0.12 \mu\text{g/ml}$ , and the fluconazole MIC was  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ .

contrast, in the USA [4] and Nordic countries [27], the second most common yeast causing bloodstream infection is *C. glabrata*, and *C. parapsilosis* is the third or fourth most common yeast.

Our analysis over the 15-y period suggests that candidemia is increasing slightly in our setting, since between 2009 and 2011 the incidence increased more than two-fold (from 3.3 to 7.4 cases/100,000 population). The incidence of candidemia in 2011 was the highest in the 15 y of the study. This increase is in keeping with the rising incidence of fungemia reported by other authors [28]. The distribution of *Candida* species causing bloodstream infection is also changing, as can be seen by the results obtained in this study in which the frequency of *C. albicans* decreased during the last years of the study (2002–2010), whereas the frequency of *C. parapsilosis* and *C. glabrata* tended to increase. These findings also agree with the results obtained in other studies that detected a shift towards non-*C. albicans* species in the last decade [29,30]. These changes in the epidemiology of fungemia could be due to factors such as the use of fluconazole and the echinocandins as first-line agents to treat candidemia or as prophylaxis, and to an increase in the life-expectancy of severely ill or immunosuppressed patients.

The *Candida* species causing candidemia varied according to age. It is well known that the frequency of *C. parapsilosis* in paediatric patients is high, but most reports have described a higher frequency of *C. albicans* than *C. parapsilosis* in both neonates and children [9,29,31]. The results obtained in our survey showed that the most common species isolated in patients aged <15 y was *C. parapsilosis*, rather than *C. albicans*. This agrees with the results obtained in a study conducted in Spain by García-Rodríguez et al. in 2013; the study included only paediatric patients and showed that the most frequently isolated species in newborns was *C. albicans*, whereas in all other age groups the predominant species was *C. parapsilosis*, with a prevalence of 43% considering all study cases [32]. These discrepancies between study findings can be explained by the different age ranges, differences in geographic regions, and individual comorbidity. Like other authors, we also found that the frequency of *C. glabrata* increased with age.

As in previous studies, we found that the general frequency of both *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* was low compared to that of *C. parapsilosis sensu stricto*. However, the frequency of these 2 species may differ between countries and also within in the same country. The prevalences of *C. orthopsilosis* (1.5%) and *C. metapsilosis* (0%) obtained in the present study were lower than those reported in other studies in the Iberian Peninsula, in which the prevalences ranged from 1.6% to 23.54% and from

0.8% to 2.9%, respectively [14,24,25,33,34]. Several factors have been described as the cause of these low but highly variable incidence rates of *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. Tavanti et al. [35] and Bertini et al. [36] demonstrated that these 2 cryptic species have a reduced virulence potential in terms of biofilm formation, adhesion capacity, and pathogenic potential when compared with *C. parapsilosis sensu stricto*. Miranda-Zapico et al. analysed the prevalence of *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in a collection of 329 strains previously identified as *C. parapsilosis* from different body sites. *C. orthopsilosis* was more commonly isolated from blood (5.1%) than from other specimens, whereas *C. metapsilosis* was most commonly isolated from otic and wound specimens (10.3%) or from the vagina (10%) than from blood (1.7%). Moreover, their study demonstrated that the incidence of *C. orthopsilosis* could be higher in warmer Mediterranean countries than in cooler countries and suggested that the differences in hospital services and the patient population could contribute to the high variability in cryptic species [25]. These findings could explain the absence of *C. metapsilosis* strains and the low incidence of *C. orthopsilosis* in our series of *C. parapsilosis* complex isolates causing fungemia.

In the current study we analysed the susceptibility of 68 *C. parapsilosis* isolates to 9 antifungal agents, applying the new species-specific clinical breakpoints. We detected a low prevalence of resistant isolates for almost all antifungal agents in all study years. Sixty-seven *C. parapsilosis* isolates out of 68 were classified as echinocandin-susceptible, however it is important to highlight that all *C. parapsilosis* isolates displayed an intrinsic low susceptibility to the 3 echinocandins and that the MIC<sub>90</sub>s were higher for MFG (2 µg/ml) and AFG (2 µg/ml) than that for CFG (1 µg/ml). It is not clear why *C. parapsilosis* complex isolates show an intrinsic low susceptibility to echinocandins, however van Asbeck et al. suggested that these differences could be the result of variations in the cell wall compounds, a lower affinity of the glucan synthase complex to echinocandins, or variations in the regulatory network of this complex [37]. Moreover, it remains unclear whether a decrease in susceptibility, both intrinsic and extrinsic, to echinocandins correlates with clinical failure in *C. parapsilosis*. In 1 patient in our survey, we identified a *C. parapsilosis sensu stricto* isolate that was non-susceptible to CFG, FLC, and ITC. This patient was under treatment with CFG but nevertheless showed a notable improvement. Pfaller et al. [16] compared the relationship between the MIC and clinical outcome for candidiasis and the echinocandins. The results obtained showed that 88%, 75%, and 82% of patients infected by a *C. parapsilosis* isolate with a MIC ≤ 4

460 M. Martí-Carrizosa et al.

µg/ml for AFG, CFG, or MFG, respectively, were treated successfully with echinocandins [25]. These findings might indicate that fungemia caused by a *C. parapsilosis sensu stricto* isolate with an intermediate susceptibility to any echinocandin could be treated successfully with echinocandins.

*C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* appear to be more susceptible to the vast majority of antifungal agents than *C. parapsilosis sensu stricto* [24]. Unfortunately, in our study we were unable to compare the susceptibility patterns between *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* and their evolution over the years because the prevalence of the 2 cryptic species was low.

In conclusion, this study highlights an increasing trend of *C. parapsilosis* over the years, becoming the second most common species causing fungemia in the total number of episodes and the most common species in the paediatric population in this study. Such an increase in frequency suggests that the prevalence and susceptibility patterns of *C. parapsilosis* should be monitored, particularly in paediatric patients.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Carolyn Newey for the English language revision and Ignasi J. Gich for the statistical analysis.

**Declaration of interest:** The authors declare no conflicts of interest and no financial support.

### References

- [1] Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003;37:1172–7.
- [2] Hazen KC, Baron EJ, Colombo AL, Girmenia C, Sanchez-Sousa A, del Palacio A, et al. Comparison of the susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-year global evaluation Using disk diffusion. *J Clin Microbiol* 2003;41:5623–32.
- [3] González GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol* 2008;46:2902–5.
- [4] Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol* 2012;50:3435–42.
- [5] Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arıkan-Akdaglı S, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect* 2012;7(Suppl):53–67.
- [6] Lortholary O, Petrikos G, Akova M, Arendrup MC, Arıkan-Akdaglı S, Bassetti M, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: patients with HIV infection or AIDS. *Clin Microbiol Infect* 2012;7(Suppl):68–77.
- [7] Hope WW, Castagnola E, Groll AH, Røilides E, Akova M, Arendrup MC, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by *Candida* spp. *Clin Microbiol Infect* 2012;7(Suppl):38–52.
- [8] Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 2012;7(Suppl):19–37.
- [9] Córdoba S, Vivor W, Bosco-Borgeat ME, Taverna C, Szusz W, Murisengo O, et al. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2011;43:176–85.
- [10] Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1181–7.
- [11] Bassetti M, Taramasso L, Nicco E, Molinari MP, Mussap M, Viscoli C. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. *PLoS One* 2011;6:e24198.
- [12] Ece G, Samlioglu P, Akkoçlu G, Atalay S, Kose S. The evaluation of the distribution of yeast like fungi “*Candida* Species” at a tertiary care center in western Turkey. *Int J Med Sci* 2012;9:617–20.
- [13] Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005;43:284–92.
- [14] Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:5590–6.
- [15] Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat* 2010;13:180–95.
- [16] Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, et al. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat* 2011;14:164–76.
- [17] Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for posaconazole and voriconazole and *Candida* spp. as determined by 24-hour CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol* 2011;49:630–7.
- [18] Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Alexander BD, et al. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:330–43.

- [19] Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema DJ, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol* 2012;50:2040–6.
- [20] Clinical and Laboratory Standard Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Fourth informational supplement M27-S4. Wayne, PA: CLSI; 2012.
- ▶ [21] Fortún J, Martín-Dávila P, Gómez-García de la Pedrosa E, Pintado V, Cobo J, Fresco G, et al. Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. *J Infect* 2012;65:64–70.
- ▶ [22] Cuenca-Estrella M, Rodríguez D, Almirante B, Morgan J, Planes AM, Almela M, et al. In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002–2003. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:194–9.
- ▶ [23] Rodríguez-Hernández MJ, Ruiz-Pérez de Pipaon M, Márquez-Solero M, Martín-Rico P, Castón-Osorio JJ, Guerrero-Sánchez FM, et al. [Candidemias: multicentre analysis in 16 hospitals in Andalusia (Spain)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29:328–33.
- ▶ [24] Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlín DS. Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2739–48.
- ▶ [25] Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, et al. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:2315–22.
- [26] Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2013 Aug 29. [Epub ahead of print]
- ▶ [27] Poikonen E, Lyytikäinen O, Anttila VJ, Koivula I, Lumio J, Kotilainen P, et al. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004–2007. *BMC Infect Dis* 2010;10:312.
- ▶ [28] Tortorano AM, Prigitano A, Lazzarini C, Passera M, Deiana ML, Cavinato S, et al. A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. *Infection* 2013;41:655–62.
- ▶ [29] Arendrup MC, Dzajic E, Jensen RH, Johansen HK, Kjaeldgaard P, Knudsen JD, et al. Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E343–53.
- ▶ [30] Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect* 2008;56:126–9.
- ▶ [31] Nucci M, Queiroz-Ielles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One* 2013;8:e59373.
- ▶ [32] García-Rodríguez J, Cantón E, Pemán J, Alvarez M, Ezpeleta G, Gómez-Nieto A, et al. [Age group, geographical incidence and patterns of antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia in the Spanish paediatric population]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31:363–8.
- ▶ [33] De Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:418–24.
- ▶ [34] Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 2009;47: 2392–7.
- ▶ [35] Tavanti A, Hensgens LA, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol* 2007;45:1455–62.
- ▶ [36] Bertini A, De Bernardis F, Hensgens LA, Sandini S, Senesi S, Tavanti A. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *Int J Med Microbiol* 2013; 303:98–103.
- ▶ [37] Van Asbeck E, Clemons KV, Martinez M, Tong AJ, Stevens DA. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;62:106–9.

## 8.2. Implication of *Candida parapsilosis* *FKS1* and *FKS2* mutations in reduced echinocandin susceptibility (*In press*)

AAC Accepted Manuscript Posted Online 16 March 2015  
 Antimicrob. Agents Chemother. doi:10.1128/AAC.04922-14  
 Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

1 Implication of *Candida parapsilosis* *FKS1* and *FKS2* mutations in reduced  
 2 echinocandin susceptibility

3

4

5 M Martí-Carrizosa<sup>1,2,3</sup>, F Sánchez-Reus<sup>1,2,3,#</sup>, F March<sup>1,2</sup>, E Cantón<sup>4</sup>, P Coll<sup>1,2,3</sup>

6

7 <sup>1</sup>Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

8 <sup>2</sup>Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain.

9 <sup>3</sup>Dept Genet & Microbiol, Univ Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

10 <sup>4</sup>Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación, Hospital

11 Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

12

13

14 Running Head: *Candida parapsilosis* *FKS1* and *FKS2* Mutations

15 **Word count for abstract: 73 words**

16 **Word count for the body text: 1061 words**

17

18 # Address correspondence to F Sánchez-Reus<sup>1</sup>, fsanchezr@santpau.cat.

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29 **ABSTRACT**

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

We evaluated *FKS1* and *FKS2* mutations in *Candida parapsilosis* bloodstream isolates and correlated them with echinocandin MIC values determined by M27-A3 and YeastOne methods. All mutations were detected outside HS regions. F1386S mutation detected in a resistant isolate by YeastOne method but not by M27-A3, could be implied in echinocandin resistance. Further studies are needed to confirm the implication of F1386S and to elucidate the capability of M27-A3 method to detect echinocandin resistance.

61 The Fksp subunits of the  $\beta$ -1,3-d-glucan synthase enzyme are the target of  
62 echinocandins (1) and are encoded by *FKS1*, *FKS2* and *FKS3* genes. Acquired reduced  
63 echinocandin susceptibility (RES) in most of the strains of *Candida* spp. involves high  
64 echinocandin MICs and amino acid substitutions in two hot spot (HS) regions of the  
65 *FKS1* and *FKS2* genes (2–9).

66

67 The mechanism leading to acquired RES in *Candida parapsilosis* isolates has  
68 not yet been described, since no clinical isolates with acquired echinocandin resistance  
69 have revealed mutations in either HS1 or HS2 regions of the *FKS1* gene (10–13). The  
70 only mutation described to date in the HS regions is a naturally occurring proline to  
71 alanine substitution in the HS1 region of the *FKS1* gene. This polymorphism is  
72 responsible for the intrinsic RES of *C. parapsilosis* to echinocandins (14). Regarding  
73 the *FKS2* gene, mutations in the HS regions have not yet been analysed.

74

75 Our aim was to analyse resistance to echinocandins against 77 bloodstream *C.*  
76 *parapsilosis* sensu stricto isolates by correlating acquired *FKS* gene alterations with  
77 MIC values of caspofungin (CFG), micafungin (MFG) and anidulafungin (AFG)  
78 determined by the CLSI M27-A3 document guidelines (15) and by the Sensititre®  
79 YeastOne SYO-10 panel (Trek Diagnostic System, England). MICs were read after 24h  
80 of incubation and the interpretive criteria used were those published in CLSI document  
81 M27-S4 (16). Molecular identification was performed by sequencing the ITS1 and  
82 ITS2 regions (17). Genomic DNA was extracted using the commercial method  
83 InstaGene Matrix (BioRad). The fragments including HS1 (amino acids 537-793) and  
84 HS2 (amino acids 1277-1488) regions of *FKS1* gene were characterized in all *C.*  
85 *parapsilosis* isolates using the *Candida FKS* universal primers (14). The fragments  
86 including HS1 (amino acids 476-669) and HS2 (amino acids 1114-1316) regions of  
87 *FKS2* gene were analysed in a subset of 21 isolates (6 YeastOne resistant isolates, 9  
88 susceptible isolates with a *FKS1* mutation and 6 other susceptible isolates) using  
89 primers designed for this study: CpF2H1F 5'-CCAACCGCAAATACTTACC-3',  
90 CpF2H1R 5'-AATGATGCCTCCTTCTTGAC-3', CpF2H2F 5'-  
91 TATGCAATGCGGTAAAGGAC-3' and CpF2H2R 5'-  
92 CTCCACGGCAAATCTTGAG-3'. DNA sequences were compared to *C. parapsilosis*  
93 reference sequences (GeneBank accession no. EU221325 and EU221326 for *FKS1* and  
94 *FKS2* genes) (14).

3

95           Employing the YeastOne, six of the 77 *C. parapsilosis* isolates were resistant  
96 to at least one echinocandin while employing the M27-A3 isolates were susceptible  
97 to the three echinocandins (Table 1). The essential agreement (EA) between methods  
98 for the three echinocandins was 98.7%, lower than that reported in other studies in  
99 which no resistant *C. parapsilosis* isolates were included (18, 19). The categorical  
100 agreement (CA) was 92.3%, 94.8% and 98.7% for AFG, MFG and CFG, respectively.  
101 CFG is the agent with higher CA, despite *in vitro* susceptibility testing of CFG currently  
102 not being recommended due to reproducibility problems (20, 21). The majority of the  
103 errors were observed in the isolates classified as susceptible by M27-A3 and  
104 intermediate to AFG (minor error: 6.2%), MFG (minor error: 3.9%) or CFG (minor  
105 error: 1.3%) by the YeastOne. Major errors were observed with AFG (1.5%) and MFG  
106 (1.3%) where in each case there was one isolate resistant by YeastOne and susceptible  
107 by M27-A3. Since it seems that there is no concordance between the YeastOne and the  
108 M27-A3 methods in detecting the resistant isolates, more studies are necessary to  
109 elucidate which method best classifies the isolates that harbour resistance mechanisms.

110

111           All *C. parapsilosis* isolates analysed harboured the previously described  
112 naturally-occurring polymorphism P660A in the HS1 region of the *FKSI* (14).  
113 However, despite observing an appreciable range of echinocandin MIC values by the  
114 YeastOne, none of the 77 *C. parapsilosis* isolates harboured mutations in either HS1  
115 (652-660) or HS2 (1369-1376) regions of the *Fks1p*, apart from the naturally occurring  
116 polymorphism.

117

118           Sequence alignments showed that 11 of the 77 (14.3%) *C. parapsilosis* isolates  
119 harbour mutations outside the two HS regions of the *FKSI* gene which have not  
120 previously been described. Six of the 11 mutations were detected in a single allele  
121 (heterozygous), and the remaining 5 were detected in both alleles (homozygous). The  
122 mutations were: V595I (1 isolate), S745L (6 isolates that subsequently showed  
123 clonal relationship), M1328I (2 isolates), F1386S (1 isolate) and A1422G (1 isolate)  
124 (Table 1). S745L, M1328I and A1422G were identified in nine echinocandin  
125 susceptible isolates, suggesting that these mutations are not implied in the susceptibility  
126 to echinocandins. On the other hand, V595I and F1386S were identified exclusively in  
127 echinocandin resistant isolates by YeastOne (Table 1). The homozygous mutation  
128 V595I was identified in the only strain that was intermediate to caspofungin (MIC, 4

4

129  $\mu\text{g/mL}$ ) but this mutation is a conservative substitution. However, the heterozygous  
130 mutation F1386S was identified in a strain that was resistant to AFG (MIC, 8  $\mu\text{g/mL}$ )  
131 and intermediate to MFG (MIC, 4  $\mu\text{g/mL}$ ). This mutation was non conservative and  
132 interestingly, we found that it was situated 10 amino acids beyond the HS2 region  
133 (1369-1376).

134

135 As seen in Table 2, the phenylalanine residue was highly conserved in the 7  
136 *Candida* species and in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and the valine residue,  
137 situated in the 595 position, was conserved in the 7 *Candida* species. This high  
138 homology (74%), observed between *S. cerevisiae* and *C. parapsilosis*  $\beta$ -1,3-d-glucan  
139 synthase enzymes, led us to extrapolate the described topology from *S. cerevisiae* (22)  
140 to that for *C. parapsilosis*, and to consider that the mutation V595I is located in a  
141 transmembrane domain, and the mutation F1386S is located externally and close to the  
142 HS2 region.

143

144 We found that none of the 21 *C. parapsilosis* isolates screened for *FKS2* gene  
145 alterations presented mutations in HS1 and HS2 regions, which suggest a lack of  
146 involvement of this gene in the susceptibility to echinocandins in *C. parapsilosis*.

147

148 Our findings highlight the lack of correlation between the YeastOne and M27-  
149 A3 methods in detecting echinocandin resistant *C. parapsilosis* clinical isolates.  
150 Moreover, our findings highlight the absence of mutations in the HS regions of *FKS1*  
151 and *FKS2* genes in those isolates resistant to echinocandins using the YeastOne method.  
152 This suggests other regions of these genes may harbour mutations, such as the F1386S  
153 or V595I, which we found outside HS regions, as has also recently been described in *S.*  
154 *cerevisiae* (23). However, these results should be confirmed by genetic engineering or  
155 by determining the 50% inhibitory concentrations for the mutant enzymes because other  
156 mechanisms such as a compensatory increase in the production of chitin may also play  
157 an important role in decreasing the efficacy of the echinocandins both *in vitro* and *in*  
158 *vivo* (24–26).

159

#### 160 **ACKNOWLEDGMENTS**

161 The authors would like to thank Carolyn Newey and Jonathan Holden for help with the  
162 English revision.

5

163 The authors declare no conflicts of interest and no financial support  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202

## 203 REFERENCES

204

- 205 1. Douglas CM, D'Ippolito JA, Shei GJ, Meinz M, Onishi J, Marrinan JA, Li  
206 W, Abruzzo GK, Flattery A, Bartizal K, Mitchell A, Kurtz MB. 1997.  
207 Identification of the *FKSI* gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-  
208 beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2471–9.
- 209 2. Lewis JS, Wiederhold NP, Wickes BL, Patterson TF, Jorgensen JH. 2013.  
210 Rapid Emergence of Echinocandin Resistance in *Candida glabrata* Resulting in  
211 Clinical and Microbiologic Failure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:4559–61.
- 212 3. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortígosa C, Catania J,  
213 Booker R, Castanheira M, Messer SA, Perlin DS, Pfaller MA. 2013.  
214 Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure  
215 correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory  
216 concentrations. *Clin. Infect. Dis.* **56**:1724–32.
- 217 4. Jensen RH, Justesen US, Rewes A, Perlin DS, Arendrup MC. 2014.  
218 Echinocandin failure case due to a yet unreported *FKSI* mutation in *Candida*  
219 *krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**:33–36.
- 220 5. Imtiaz T, Lee KK, Munro C a, Maccallum DM, Shankland GS, Johnson  
221 EM, Macgregor MS, Bal AM. 2012. Echinocandin resistance due to  
222 simultaneous *FKS* mutation and increased cell wall chitin in a *Candida albicans*  
223 bloodstream isolate following brief exposure to caspofungin. *J. Med. Microbiol.*  
224 **61**:1330–4.
- 225 6. Garcia-Effron G, Chua DJ, Tomada JR, DiPersio J, Perlin DS, Ghannoum  
226 M, Bonilla H. 2010. Novel *FKS* mutations associated with echinocandin  
227 resistance in *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:2225–7.
- 228 7. Dannaoui E, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Grenouillet F, Cassaing  
229 S, Baixench M-T, Bretagne S, Dromer F, Lortholary O. 2012. *Candida* spp.  
230 with acquired echinocandin resistance, France, 2004-2010. *Emerg. Infect. Dis.*  
231 **18**:86–90.
- 232 8. Castanheira M, Woosley LN, Messer SA, Diekema DJ, Jones RN, Pfaller  
233 MA. 2014. Frequency of *fks* Mutations among *Candida glabrata* Isolates from a  
234 10-Year Global Collection of Bloodstream Infection Isolates. *Antimicrob. Agents*  
235 *Chemother.* **58**:577–80.
- 236 9. Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones  
237 RN. 2012. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins  
238 among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J. Clin.*  
239 *Microbiol.* **50**:1199–203.

7

- 240 10. **Castanheira M, Woosley LN, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN, Pfaller**  
241 **MA.** 2010. Low prevalence of *fks1* hot spot 1 mutations in a worldwide  
242 collection of *Candida* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:2655–9.
- 243 11. **Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin DS.** 2012.  
244 Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato  
245 species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. *J.*  
246 *Antimicrob. Chemother.* **67**:2739–48.
- 247 12. **Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M.** 2013.  
248 Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical  
249 opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of  
250 new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for  
251 characterization of geographic. *J. Clin. Microbiol.* **51**:2571–81.
- 252 13. **Ghannoum MA, Chen A, Buhari M, Chandra J, Mukherjee PK, Baxa D,**  
253 **Golembieski A, Vazquez JA.** 2009. Differential in vitro activity of  
254 anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* isolates  
255 recovered from a burn unit. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**:274–9.
- 256 14. **Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS.** 2008. A  
257 naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in *Fks1p* in *Candida*  
258 *parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for  
259 reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2305–  
260 12.
- 261 15. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for  
262 broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd  
263 ed. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute,  
264 Wayne, PA.
- 265 16. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2012. Reference method for  
266 broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informa-  
267 tional supplement. CLSI document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards  
268 Institute, Wayne, PA.
- 269 17. **Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC.** 2005. *Candida*  
270 *orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis*  
271 groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* **43**:284–92.
- 272 18. **Pfaller MA, Chaturvedi V, Diekema DJ, Ghannoum M A, Holliday NM,**  
273 **Killian SB, Knapp CC, Messer SA, Miskov A, Ramani R.** 2008. Clinical  
274 evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel for antifungal  
275 susceptibility testing of the echinocandins anidulafungin, caspofungin, and  
276 micafungin. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2155–2159.
- 277 19. **Pfaller MA, Chaturvedi V, Diekema DJ, Ghannoum MA, Holliday NM,**  
278 **Killian SB, Knapp CC, Messer SA, Miskou A, Ramani R.** 2012. Comparison  
279 of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI microdilution  
280 for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against *Candida* spp.,

- 281 using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diagn.*  
282 *Microbiol. Infect. Dis.* **73**:365–8.
- 283 20. **Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, Bonfietti LX, Bustamante B,**  
284 **Canton E, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Fothergill A,**  
285 **Fuller J, Gaustad P, Gonzalez GM, Guarro J, Lass-Flörl C, Lockhart SR,**  
286 **Meis JF, Moore CB, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, Pukinskas SRBS, St-**  
287 **Germain G, Szesz MW, Turnidge J.** 2013. Interlaboratory variability of  
288 Caspofungin MICs for *Candida* spp. Using CLSI and EUCAST methods: should  
289 the clinical laboratory be testing this agent? *Antimicrob. Agents Chemother.*  
290 **57**:5836–42.
- 291 21. **Pfaller MA, Dickema DJ, Jones RN, Castanheira M.** 2014. Use of  
292 anidulafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to  
293 caspofungin among 4,290 clinical isolates of *Candida* by using CLSI methods  
294 and interpretive criteria. *J. Clin. Microbiol.* **52**:3223–9.
- 295 22. **Johnson M, Edlind T.** 2012. Topological and mutational analysis of  
296 *Saccharomyces cerevisiae* Fks1. *Eukaryot. Cell* **11**:952–960.
- 297 23. **Johnson ME, Katiyar SK, Edlind TD.** 2011. New Fks hot spot for acquired  
298 echinocandin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its contribution to  
299 intrinsic resistance of *Scedosporium* species. *Antimicrob. Agents Chemother.*  
300 **55**:3774–81.
- 301 24. **Walker LA, Gow NAR, Munro CA.** 2013. Elevated chitin content reduces the  
302 susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob. Agents*  
303 *Chemother.* **57**:146–54.
- 304 25. **Lee KK, Maccallum DM, Jacobsen MD, Walker LA, Odds FC, Gow NAR,**  
305 **Munro C a.** 2012. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers  
306 echinocandin resistance in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:208–17.
- 307 26. **Walker LA, Munro CA, de Bruijn I, Lenardon MD, McKinnon A, Gow**  
308 **NAR.** 2008. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from  
309 echinocandins. *PLoS Pathog.* **4**:e1000040.
- 310
- 311
- 312
- 313
- 314
- 315

316 Table 1: Results of the *in vitro* antifungal susceptibility testing to echinocandins and amino acid  
 317 substitutions in Fks1p for the non-susceptible isolates and for the susceptible isolates with mutation in the  
 318 Fks1p.  
 319

| Strain              | MIC ( $\mu$ g/mL) <sup>a</sup> |     |       |                         |     |     | Amino acid change in Fks1p |
|---------------------|--------------------------------|-----|-------|-------------------------|-----|-----|----------------------------|
|                     | YeastOne                       |     |       | Reference method (CLSI) |     |     |                            |
|                     | AFG                            | MFG | CFG   | AFG                     | MFG | CFG |                            |
| 1161LL              | 4                              | 4   | 1     | 2                       | 1   | 2   | wt <sup>c</sup>            |
| 1064LL              | 1                              | 2   | 1     | 1                       | 1   | 2   | M1328I <sup>d</sup>        |
| 1031LL              | 1                              | 1   | 0.5   | 2                       | 1   | 1   | S745S/L <sup>d</sup>       |
| 928LL               | 2                              | 2   | 4     | 1                       | 1   | 1   | V595I <sup>d</sup>         |
| 831LL               | 1                              | 1   | 0.5   | 2                       | 1   | 1   | S745L <sup>d</sup>         |
| 713LL               | 1                              | 1   | 0.25  | 1                       | 1   | 1   | S745S/L <sup>d</sup>       |
| 681LL               | 1                              | 2   | 0.5   | 2                       | 1   | 1   | A1422G <sup>d</sup>        |
| 544LL               | 1                              | 1   | 0.125 | 1                       | 1   | 1   | S745S/L <sup>d</sup>       |
| 474LL               | 1                              | 1   | 0.25  | 1                       | 1   | 1   | M1328I <sup>d</sup>        |
| 462LL               | 2                              | 2   | 0.5   | 1                       | 1   | 1   | S745S/L <sup>d</sup>       |
| ST-14 <sup>b</sup>  | 8                              | 4   | 1     | 1                       | 1   | 1   | F1386F/S <sup>d</sup>      |
| RS-16 <sup>b</sup>  | 4                              | 8   | 2     | 2                       | 1   | 1   | wt                         |
| CP-368 <sup>b</sup> | 4                              | 1   | 0.5   | 2                       | 1   | 1   | wt                         |
| CP-372 <sup>b</sup> | 4                              | 4   | 2     | 1                       | 1   | 2   | wt                         |
| AX-32 <sup>b</sup>  | 1                              | 1   | 0.5   | 1                       | 1   | 1   | S745S/L <sup>d</sup>       |

320 <sup>a</sup>MICs interpretive criteria used were those published in the CLSI M27-S4 document:  $\leq 2$   $\mu$ g/mL (susceptible), 4  
 321  $\mu$ g/mL (intermediate),  $\geq 8$   $\mu$ g/mL (resistant) for *C. parapsilosis* and all 3 echinocandins (16). CFG, caspofungin,  
 322 MFG, micafungin; AFG, anidulafungin.

323 <sup>b</sup> Strains obtained from the culture collection of the Hospital Universitario la Fe (Valencia, Spain).

324 <sup>c</sup> Wt: wild type.

325 <sup>d</sup> Mutations identified in non-HS regions.

326

327 **Table 2:** Alignment of the Fks1p sequence from 7 *Candida* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*.

| Organism                | 592     | *     | 598     | 742   | *       | 748   | 1325    | *     | 1331    | 1383  | * | 1389 | 1419 | * | 1425 |
|-------------------------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---|------|------|---|------|
| <i>C. parapsilosis</i>  | F F A V | M P L | R I Y S | K I L | Q V F M | L V L | F I S F | I P L | V F V A | Q I Y |   |      |      |   |      |
| <i>C. orthopsilosis</i> | F F A V | M P L | R I Y S | K I L | Q V F M | L V L | F I S F | I P L | V F V A | Q I Y |   |      |      |   |      |
| <i>C. metapsilosis</i>  | F F A V | M P L | R I Y S | K I L | Q V F M | L V L | F I S F | I P L | V F V A | Q I Y |   |      |      |   |      |
| <i>C. albicans</i>      | F F A V | M P L | R I Y S | K I L | Q V F I | L V L | F I S F | I P L | V F V A | Q I Y |   |      |      |   |      |
| <i>C. glabrata</i>      | F F S V | M P L | R I Y S | K I L | Q M F M | L T L | W I A F | V P I | V F A G | Q I Y |   |      |      |   |      |
| <i>C. tropicalis</i>    | - - -   | - - - | R I Y S | K I L | Q V F I | L V L | F I S F | I P L | V F V A | Q I Y |   |      |      |   |      |
| <i>C. krusei</i>        | Y L T V | M P L | R I Y S | K V L | Q M F M | L T L | F I S F | V P L | V F V A | Q V Y |   |      |      |   |      |
| <i>S. cerevisiae</i>    | F F S I | M P L | R I Y S | K I L | Q M F M | L T L | W I A F | V P I | V F A G | Q I Y |   |      |      |   |      |

328 The three surrounding amino acids before and after the point mutations V595I, S745L, M1328I, F1386S and A1422G  
 329 (marked with \*) are shown. The alignment was generated using the ClustalW program. The amino acid numbering  
 330 has been taken from the *C. parapsilosis* Fks1p. "-" indicated a gap in the protein sequence. The following GenBank  
 331 accession numbers have been used: *C. parapsilosis*, ABX80511.1; *C. orthopsilosis*, XP\_003867907.1; *C.*  
 332 *metapsilosis*, ABY67254.1; *C. albicans*, BAA21535; *C. glabrata*, XP\_446406.1; *C. tropicalis*, XP\_002550363; *C.*  
 333 *krusei*, AAY40291.2; *S. cerevisiae*, AAC13763.1.

334

335

336

## **9. ANEXO II: COMUNICACIONES A CONGRESO**



1. *Candida parapsilosis*: epidemiología, sensibilidad y análisis del gen *FKS1*. Martí M, March F, Sánchez F. XI Congreso Nacional de Micología. Cádiz (España). 2011.
2. Análisis de los genes *FKS* en aislados de *Candida* no sensibles a las equinocandinas. Martí M, March F, Sánchez F. SEIMC. Zaragoza (España). 2013.
3. Analysis of the main resistance mechanism to echinocandins in a large collection of clinical *Candida* isolates from Spain. Sánchez F, Martí M, March F. TIMM. Copenhagen (Denmark). 2013.
4. Tipificación de aislados de *Candida parapsilosis* mediante el uso de microsatélites. Martí M, March F, Sánchez F. VI Fórum Micológico. Alicante (España). 2013.



## **10.ANEXO III: TRATAMIENTO DE LA CANDIDIASI INVASIVA**



## Recomendaciones de la SEIMC sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva (94)

❖ Recomendaciones en el tratamiento de la candidiasis invasiva en pacientes oncohematológicos:

1. En pacientes neutropénicos hemodinámicamente inestables o con antecedentes de administración previa de azoles como profilaxis, en los que existe posibilidad de presentar una candidiasis resistente a fluconazol, ante el hallazgo de una levadura en sangre debe iniciarse tratamiento empírico con una candina: caspofungina (70mg de carga y 50mg/d después) (A-II)<sup>1</sup>, micafungina (100 mg/d) (A-II) o anidulafungina (200mg de carga y después 100 mg/d) (A-II). La anfotericina B liposomal (3 mg/kg/d) constituye una alternativa en esta situación (A-II).
2. En pacientes clínicamente estables, sin exposición previa a azoles, fluconazol (800 mg/d [12 mg/kg/d] y después 400 mg/d [6 mg/kg/d]) es una alternativa razonable (A-II). En situaciones en las que además se desee hacer una cobertura frente a hongos filamentosos puede iniciarse tratamiento con voriconazol (6 mg/kg/12 h dos dosis y seguir con 3mg/kg/12 h) (A-II).
3. Una vez identificada la especie de *Candida*, en infecciones producidas por *C. glabrata* se prefiere una candina (B-III) o anfotericina B liposomal (3 mg/kg), (B-III). Si el paciente recibía fluconazol o voriconazol y ha presentado buena respuesta clínica y los cultivos de seguimiento son negativos, parece razonable continuar con la misma pauta (C-III).
4. Si se aísla *C. parapsilosis*, fluconazol es el tratamiento de elección (B-III) y anfotericina B liposomal su alternativa (B-III). Para infecciones producidas por *C. krusei*, se recomienda una candina, anfotericina B liposomal o voriconazol (B-III).
5. En pacientes en tratamiento con una candina o anfotericina B lipídica, si la especie aislada es sensible a fluconazol y el paciente está clínicamente estable, se debería sustituir el tratamiento antifúngico por fluconazol (C-III).
6. El tratamiento recomendado para una candidemia no complicada es de un mínimo de 14 días tras el primer hemocultivo negativo, si existe resolución de la clínica y

---

<sup>1</sup> Strength of a Recommendation (SoR): Grade A ESCMID strongly supports a recommendation for use; Grade B ESCMID moderately supports a recommendation for use; Grade C ESCMID marginally supports a recommendation for use; Grade D ESCMID supports a recommendation against use. Quality of Evidence (QoE): Level I Evidence from at least one properly designed randomized, controlled trial; Level II: Evidence from at least one well-designed clinical trial, without randomization; from cohort or case-controlled analytic studies (preferably from >1 centre); from multiple time series; or from dramatic results of uncontrolled experiments; Level III Evidence from opinions of respected authorities, based on clinical experience, descriptive case studies, or reports of expert committees (91).

recuperación de la neutropenia (A-III).

7. En toda candidemia en un paciente neutropénico debería considerarse la retirada del CVC (B-III).

8. En el tratamiento antifúngico empírico durante la neutropenia febril, cuando se sospeche una candidemia, se recomienda usar anfotericina B liposomal (3 mg/kg/d) (A-I) o caspofungina (70mg de carga y 50mg/d) (A-I) o voriconazol (6 mg/kg/12h dos dosis y seguir con 3mg/kg/12h) (B-I). Como alternativas se consideraran fluconazol (dosis de carga de 800 mg/d [12 mg/kg/d] y después 400 mg/d [6 mg/kg/d]), itraconazol (200mg [3 mg/kg/12h]) (B-I) o micafungina 100 mg/d) (B-I).

9. En la candidiasis crónica diseminada, se recomienda fluconazol a dosis de 400mg (6 mg/kg/d) en pacientes clínicamente estables (A-III). En pacientes inestables o con enfermedad refractaria, se aconseja anfotericina B liposomal (3 mg/kg/d) o anfotericina B desoxicolato a dosis de 0,5-0,7 mg/kg/d (A-III). Una estrategia sería iniciar el tratamiento endovenoso con una candina o anfotericina durante 1-2 semanas y pasar a fluconazol oral a dosis de 400 mg/d (B-III). El tratamiento se mantendrá hasta la calcificación o resolución de las lesiones (A-III). Los pacientes con candidiasis crónica diseminada que requieran quimioterapia o un trasplante de progenitores hematopoyéticos continuarán con profilaxis antifúngica durante el periodo de riesgo para prevenir la recidiva («profilaxis secundaria») (A-III).

❖ Recomendaciones para el tratamiento y profilaxis de la candidiasis invasiva en el paciente que ha recibido un TOS:

1. En pacientes con CI sin neutropenia, sin signos de gravedad clínica, en ausencia de daño hepático significativo y sin antecedentes de uso previo de azoles se recomienda el uso de fluconazol (12 mg/kg la 1ª dosis, seguido de 6mg/kg/día) (A-III).

2. En pacientes sin neutropenia, que han recibido profilaxis previa con azoles, con enfermedad moderada o grave y con riesgo de infección por *C. glabrata* o *C. krusei*, o si existe daño hepático significativo, administrar preferiblemente una candina (caspofungina 70mg la 1ª dosis seguido de 50 mg/día [A-II], micafungina 100 mg/día [A-II], o anidulafungina 200mg la 1ª dosis seguido de 100 mg/día [A-II]). En caso de no poder administrar dichos fármacos, se recomienda anfotericina B liposomal (3 mg/kg/día) (B-III) o voriconazol (dosis de 6mg/kg, 2 dosis, seguido de 3mg/kg cada 12

horas) (B-III). El uso de azoles es problemático en estos pacientes por el riesgo de hepatotoxicidad y por la interacción con los fármacos anticalcineurínicos. Se recomienda determinar los niveles plasmáticos de voriconazol y de inmunosupresores.

3. En pacientes neutropénicos, administrar anfotericina B liposomal (A-II). Alternativamente una candina (caspofungina 70mg 1ª dosis y seguir con 50 mg/día [A-III], micafungina 100 mg/d [A-III] o anidulafungina 200mg 1ª dosis y seguir con 100 mg/d [A-III]) o voriconazol (dosis de 6 mg/kg, 2 dosis, seguido de

3mg/kg cada 12 horas) (B-III). El uso de azoles es problemático en estos pacientes por el riesgo de interacción con los fármacos anticalcineurínicos. Se recomienda determinar los niveles plasmáticos de voriconazol y de inmunosupresores.

4. Una vez aislada la especie de *Candida*, es importante la realización de un antifungograma. En caso de aislarse *C. parapsilosis*, se recomienda una candina (caspofungina, anidulafungina o micafungina) (B-III) o fluconazol (B-III), y como alternativa anfotericina B en formulación lipídica. En caso de aislarse *C. glabrata* es preferible administrar una candina (B-III). En cualquier caso, si la especie de *Candida* aislada es sensible a fluconazol se recomienda sustituir el tratamiento antifúngico previo por este fármaco.

5. La duración del tratamiento para candidemia sin complicaciones metastásicas es de 2 semanas tras la comprobación de que los hemocultivos se han negativizado y han desaparecido los datos clínicos atribuibles a la candidemia (A-III).

6. Se aconseja la retirada del CVC en pacientes no neutropénicos con candidemia (A-II) aunque el aislamiento de *Candida* spp. en la punta de un catéter venoso en pacientes sin fungemia no obliga necesariamente al uso de antifúngicos.

7. Los pacientes con trasplante pulmonar, pancreático e intestinal, deben recibir profilaxis antifúngica universal con fluconazol (B-II). La mayoría de los expertos no recomienda, en general, el uso de profilaxis en el trasplante cardiaco ni renal. En los trasplantados hepáticos de alto riesgo se recomienda el uso de caspofungina (B-II) durante al menos 3 semanas. Como alternativa se podría usar anfotericina B liposomal a dosis de 1-2 mg/kg/día (B-II), micafungina (C-III) o anidulafungina (C-III). Si no se analizan factores de riesgo de IFI, se recomienda profilaxis universal con fluconazol oral (3-4 semanas) (evidencia A-I, solo para *Candida*).

- ❖ Recomendaciones para el tratamiento de la candidiasis invasiva en pacientes críticos:

1. Si el paciente cumple criterios de sepsis grave, el tratamiento de elección es una candina (A-I). En esta situación de gravedad inmediata es necesario sustituir el catéter venoso (especialmente en caso de shock séptico) (A-III). Si se trata de *C. parapsilosis*, la candina ha de sustituirse por fluconazol (B-III). Eventualmente, en casos graves puede añadirse fluconazol y mantener el tratamiento con la candina hasta la mejoría clínica (B-III). Ante el aislamiento de cualquier otra especie de *Candida* debe mantenerse el tratamiento con la candina hasta alcanzar la defervescencia y estabilidad clínica. A partir de este momento el tratamiento puede seguirse por vía oral con un triazol. *C. albicans* y *C. tropicalis* pueden tratarse con fluconazol (A-II) y *C. krusei* con voriconazol (B-II). En caso de infección por *C. glabrata* es preferible mantener el tratamiento con la candina hasta disponer del antifungograma (B-III).
2. El tratamiento inicial de la CI en el paciente estable y sin criterios de gravedad depende de la probabilidad de que la infección sea debida a una cepa resistente (*C. krusei*) o potencialmente resistente (*C. glabrata*) al fluconazol. Las siguientes circunstancias se asocian a un mayor riesgo de infección por una especie de *Candida* resistente a fluconazol: a) antecedente de colonización por *C. krusei* o *C. glabrata*, detectada en los cultivos de vigilancia, o b) tratamiento con un triazol, antes o durante el episodio de candidemia. Ante cualquiera de estas circunstancias, es aconsejable iniciar el tratamiento con una candina o con voriconazol (A-II), de lo contrario puede emplearse fluconazol 800mg el primer día, seguidos de 400 mg/día (A-I).
3. En los pacientes con infección de gravedad moderada, situados entre los dos extremos descritos, es preferible iniciar el tratamiento con una candina y sustituirla por el triazol tras la mejoría clínica, la identificación de especie y, eventualmente, del resultado del antifungograma (A-III).
4. La eficacia clínica de las tres candinias es similar. La elección debe basarse en aspectos tales como la posible interacción con otros fármacos, el empleo en casos de insuficiencia hepática, los posibles efectos secundarios o el coste del tratamiento. En cualquiera de las situaciones descritas si por alergia, intolerancia u otro motivo no puede utilizarse una candina, la alternativa es el empleo de anfotericina B liposomal (3 mg/kg/día) (A-I).
5. En ausencia de lesiones metastásicas el tratamiento antifúngico de una candidemia se mantiene hasta 14 días después de la resolución de la clínica y la negativización de los hemocultivos (A-III). En presencia de coriorretinitis importante el tratamiento debe prolongarse entre 4 y 6 semanas (B-III).

6. En general, no se recomienda el uso de asociaciones de antifúngicos para el tratamiento de una candidemia. El empleo de asociaciones de antifúngicos podría considerarse en casos de mala evolución, con candidemia persistente después de la retirada del CVC, especialmente si el paciente está neutropénico.

❖ Recomendaciones para el tratamiento de la candidiasis invasiva en niños:

Candidiasis invasiva neonatal (< 1 mes)

1. La terapia de elección en los neonatos con CI es la anfotericina B desoxicolato (dosis diaria de 0,5-1,5 mg/kg o hasta una dosis acumulativa de 25-30 mg/kg) o el fluconazol (dosis diaria de 12 mg/kg) (A-II).
2. Las formulaciones lipídicas de la anfotericina B (dosis diaria de 3-5 mg/kg) son una opción alternativa a la forma desoxicolato, si puede excluirse con certeza la afectación del tracto urinario (B-II).
3. En neonatos con antecedentes de uso previo de profilaxis con fluconazol, la elección de este antifúngico como terapia inicial de la CI ha de demorarse hasta conocer la especie de *Candida* y su sensibilidad antimicrobiana (B-III).
4. La micafungina (dosis diaria de 2-4 mg/kg) es la candina más evaluada en neonatos y la única que tiene indicación hasta ahora para el tratamiento de la CI en neonatos. Se recomienda el uso de candidinas en neonatos si no es posible el uso de los antifúngicos de primera elección por toxicidad o resistencia antifúngica (B-II).
5. En los neonatos con CI o candidemia es obligatorio la retirada precoz de cualquier dispositivo médico potencialmente contaminado, en especial, los catéteres vasculares (A-II).
6. La positividad para *Candida* spp. de un cultivo de líquido estéril o de orina en un neonato hace necesario descartar una forma local o diseminada invasiva de la infección. Por lo tanto, se han de practicar cultivos de sangre, orina y LCR y un examen oftalmológico adecuado, un ecocardiograma y unas pruebas de imagen del hígado, del bazo y de los riñones (B-III).
7. La duración óptima del tratamiento antifúngico no ha de ser inferior a los 14 días después de la esterilización del lugar de la infección (LCR y/o sangre) y la retirada de los dispositivos médicos potencialmente contaminados (B-II). En determinadas formas invasivas focales (endocarditis, infecciones osteoarticulares y endoftalmitis) la duración del tratamiento ha de ser entre 4 y 12 semanas (B-III).

### Candidiasis invasiva en niños

1. El fluconazol (a dosis diaria de 6-12 mg/kg) y la anfotericina B desoxicolato (a dosis diaria de 1mg/kg) son los fármacos de elección para el tratamiento de la CI en niños inmunocompetentes (B-II).
2. La existencia de nefrotoxicidad o el uso simultáneo de fármacos nefrotóxicos desaconsejan la utilización de anfotericina B desoxicolato. En esta situación se ha de optar por una formulación lipídica de dicho fármaco (B-III).
3. La experiencia clínica publicada del uso de otros antifúngicos en niños es limitada. Entre las candidiasis la experiencia mayor es con caspofungina y micafungina (B-II). Las formulaciones lipídicas de anfotericina B y el voriconazol deben reservarse como fármacos alternativos (B-III).
4. Las recomendaciones para el tratamiento de la CI en niños inmunodeprimidos, especialmente con neutropenia asociada, han de ser similares a las de los pacientes adultos (B-III).

**11. ANEXO IV: MUTACIONES DESCRITAS EN Fks1p Y Fks2p**



**Mutaciones descritas en las regiones HS1/HS2 de Fks1p y Fks2p en aislados clínicos de *Candida* spp. sensibles y no sensibles a alguna de las 3 equinocandinas.**

| Especie                         | CIM Equinocandinas |       |       | Fks1p           |          | Fks2p           |       | Mutaciones no-HS1/HS2                  | Referencia                               |
|---------------------------------|--------------------|-------|-------|-----------------|----------|-----------------|-------|--|--|
|                                 | AFG                | CFG   | MFG   | HS1             | HS2      | HS1             | HS2   |  |  |
| <i>C. albicans</i> <sup>a</sup> | -                  | >32   | -     | S645P           |          |                 |       |  | Park <i>et al</i> (2005)(159)            |
|                                 | -                  | >32   | -     | S645Y           |          |                 |       |  | Park <i>et al</i> (2005)(159)            |
|                                 | -                  | 0,5   | -     | F641Y           |          |                 |       |  | Katiyar <i>et al</i> (2006) (233)        |
|                                 | -                  | 1     | -     | P649H           | W1358R   |                 |       |  | Desnos-Olivier <i>et al</i> (2008) (161) |
|                                 | -                  | 2     | -     | F641S,<br>S645P |          |                 |       |  | Desnos-Olivier <i>et al</i> (2008) (161) |
|                                 |                    | 2     |       |                 | W1358R   |                 |       |  | Desnos-Olivier <i>et al</i> (2008) (161) |
|                                 | 0,16               | 3     | 0,33  | F641L           |          |                 |       |  | Garcia-Effron <i>et al</i> (2009)(212)   |
|                                 | 2                  | 4     | 2,67  | S645F           |          |                 |       |  | Garcia-Effron <i>et al</i> (2009) (212)  |
|                                 | 0,83               | 2,67  | 0,83  | D648Y           |          |                 |       |  | Garcia-Effron <i>et al</i> (2009) (212)  |
|                                 | 0,25               | 2     | 0,25  |                 | R1361H   |                 |       |  | Garcia-Effron <i>et al</i> (2009) (212)  |
|                                 | 4                  | 4     | 2,67  | S645F           | R1361R/H |                 |       |  | Garcia-Effron <i>et al</i> (2009) (212)  |
|                                 | 0,5                | 4     | 1     |                 | R1361G   |                 |       |  | Eric Dannaoui <i>et al</i> (2012) (204)  |
|                                 | 0,03               | 0,5   | 0,25  | R647G           |          |                 |       |  | Eric Dannaoui <i>et al</i> (2012) (204)  |
| <i>C. glabrata</i> <sup>b</sup> | -                  | 4     | -     |                 |          | F659V           |       |  | Katiyar <i>et al</i> (2006) (233)        |
|                                 | 0,06               | 0,125 | 0,25  |                 |          | R665G           |       |  | Zimbeck <i>et al</i> (2010) (215)        |
|                                 | 0,5                | 0,25  | 0,125 |                 |          | S663P           |       |  | Zimbeck <i>et al</i> (2010) (215)        |
|                                 | 0,25               | 0,25  | 0,5   | R631G           |          |                 |       |  | Zimbeck <i>et al</i> (2010) (215)        |
|                                 | 1                  | 0,5   | 0,5   |                 |          | F659Y           |       |  | Zimbeck <i>et al</i> (2010) (215)        |
|                                 | 1                  | 0,5   | 1     | S629P           |          |                 |       |  | Zimbeck <i>et al</i> (2010) (215)        |
|                                 | 0,5                | 1     | 2     |                 |          | S663P           |       |  | Zimbeck <i>et al</i> (2010) (215)        |
|                                 | 2                  | 2     | 0,25  | P667H           |          |                 |       |  | Zimbeck <i>et al</i> (2010) (215)        |
|                                 | 8                  | >16   | 8     | S629P           |          |                 |       |  | Pfeiffer <i>et al.</i> (2010) (203)      |
|                                 | 4                  | 4     | 4     |                 |          | S663F           |       |  | Pfeiffer <i>et al.</i> (2010) (203)      |
|                                 | 0,25               | 0,25  | 0,12  | D632Y           |          |                 |       |  | Pfaller <i>et al.</i> (2012) (167)       |
|                                 | 0,25               | 0,5   | 0,03  |                 |          |                 | D648E |  | Pfaller <i>et al.</i> (2012) (167)       |
|                                 | 0,5                | 2     | 0,5   | D632H           |          |                 |       |  | Shields <i>et al.</i> (2012) (165)       |
|                                 | 0,5                | 2     | 0,5   | D632Y           |          |                 |       |  | Dannaoui <i>et al.</i> (2012) (204)      |
|                                 | 1                  | 8     | 0,5   |                 |          | F659del         |       |  | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162)   |
|                                 | 0,5                | 8     | 0,12  |                 |          | F659L           |       |  | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162)   |
|                                 | 0,125              | 8     | 1     |                 |          | F658del         |       |  | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162)   |
|                                 | 0,25               | 4     | 2     | F625I           |          | P667T           |       |  | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162)   |
|                                 | 1                  | 4     | 0,5   |                 |          | F659S,<br>L664V |       |  | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162)   |
|                                 | 0,12               | 0,25  | 0,03  | F625Y           |          |                 |       |  | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162)   |
|                                 | 1                  | 0,5   | 0,12  | F625S           |          |                 |       |  | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162)   |
|                                 | 4                  | 2     | 16    | S629P,<br>R631S |          |                 |       |  | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162)   |
|                                 | 0,03               | 0,03  | 0,015 | L630I           |          |                 |       |  | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162)   |
| 2                               | 1                  | 0,5   |       |                 | L662W    |                 |       | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162) |  |
| 1                               | 0,25               | 0,25  |       |                 | L664R    |                 |       | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162) |  |
| 0,12                            | 0,25               | 0,06  |       |                 | D666Y    |                 |       | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162) |  |

|                                     |      |      |       |        |  |  |        |                          |   |
|-------------------------------------|------|------|-------|--------|--|--|--------|--------------------------|---|
|                                     | 0,12 | 0,25 | 0,03  |        |  |  | P1371S |                          | Castanheira <i>et al.</i> (2014) (162)    |
|                                     | 0,06 | 0,06 | 0,03  |        |  |  | I1379V |                          | Alexander <i>et al.</i> (2013) (166)      |
|                                     | 0,12 | 0,5  | 0,12  |        |  |  | R665S  |                          | Alexander <i>et al.</i> (2013) (166)      |
|                                     | 1    | 0,5  | 0,25  | D632E  |  |  |        |                          | Alexander <i>et al.</i> (2013) (166)      |
|                                     | 0,06 | 0,06 | 0,03  | I634V  |  |  |        |                          | Alexander <i>et al.</i> (2013) (166)      |
|                                     | 0,06 | 0,25 | 0,015 |        |  |  |        | Y1279F (1),<br>T926P (2) | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
|                                     | 0,03 | 0,25 | 0,015 |        |  |  |        | G680S (2)                | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
|                                     | 0,06 | 0,25 | 0,015 |        |  |  |        | L195F (1)                | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
|                                     | 0,06 | 0,25 | 0,015 |        |  |  |        | F384Y (2)                | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
|                                     | 0,12 | 0,25 | 0,015 |        |  |  |        | A995T (1)                | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
|                                     | 0,06 | 0,25 | 0,015 |        |  |  |        | D140Y, A1749V<br>(1)     | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
|                                     | 0,06 | 0,12 | 0,03  |        |  |  |        | T926P (2)                | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
|                                     | 0,12 | 0,06 | 0,06  |        |  |  |        | A450T (2)                | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
|                                     | 0,25 | 0,25 | 0,06  |        |  |  |        | A1749 (1)                | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
|                                     | 0,5  | 0,25 | 0,12  |        |  |  | S663F  | T926P (2)                | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
|                                     | 1    | 0,5  | 0,5   |        |  |  | S663Y  | G680S (2)                | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
|                                     | 2    | 1    | 0,5   |        |  |  | L662W  | E78D, T926P (2)          | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
|                                     | 2    | 2    | 2     |        |  |  | S663P  | T926P (2)                | Castanheira <i>et al.</i> (2013) (167)    |
| <i>C. krusei</i> <sup>c</sup>       |      | 8    |       | L644W  |  |  |        | L701M (1)                | Desnos-Olivier (2008) (161)               |
|                                     | 0,25 | 1    | 0,25  |        |  |  |        | H675H/Q (1)              | Pfeiffer <i>et al.</i> (2010) (203)       |
|                                     | 2    | 8    | 4     | L648W  |  |  |        | L701M (1)                | Eric Dannaoui <i>et al.</i> (2012) (204)  |
|                                     | 1    | 4    | 2     | F645L  |  |  |        |                          | Eric Dannaoui <i>et al.</i> (2012) (204)  |
| <i>C. parapsilosis</i> <sup>d</sup> |      | 0,13 |       | S656P  |  |  |        |                          | Louise <i>et al.</i> (2013) (175)         |
| <i>C. tropicalis</i> <sup>e</sup>   |      | 2    |       | L79W   |  |  |        |                          | Desnos-Olivier <i>et al.</i> (2008) (161) |
|                                     | 2    | 4    | 2     | S80S/P |  |  |        |                          | Garcia-Effron <i>et al.</i> (2008) (234)  |
|                                     | 0,5  | 1    | 0,5   | F76L   |  |  |        |                          | Garcia-Effron <i>et al.</i> (2008) (234)  |
|                                     | 1    | 4    | 1     | F76S   |  |  |        |                          | Garcia-Effron <i>et al.</i> (2010) (205)  |

<sup>a</sup> *C. albicans* HS1FKS1: 641- FLTSLRDP-649; HS2FKS1: 1357- DWIRRYTL- 1364

<sup>b</sup> *C. glabrata* HS1FKS1: 625- FLILSIRDP-633; HS2FKS1: 1340-DWVRRYTL-1347; HS1FKS2: 659-FLILSLRDP-667; HS2FKS2: 1374-DWIRRYTL-1381.

<sup>c</sup> *C. krusei* HS1FKS1: 655-FLILSIRDP-663; HS2FKS1: 1364-DWIRRYTL-1371

<sup>d</sup> *C. parapsilosis* HS1FKS1: 652-FLTSLIRDA-660; HS2FKS1: 1369- DWIRRYTL-1376

<sup>e</sup> *C. tropicalis* HS1FKS1: 76-FLTSLRDP-84; HS2FKS1: 792-DWIRRYTL-799

(1) Mutaciones situadas fuera de la región HS1/HS2 del gen *FKS1*

(2) Mutaciones situadas fuera de la región HS1/HS2 del gen *FKS2*

