



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Perfil de sensibilidad antifúngica en aislados de
Candida guilliermondii causantes de candidemia en
pacientes pediátricos. Comparación de dos
métodos de microdilución en caldo.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Fernando Torres Santander



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Abel Gutiérrez Ramos

VOCAL: Alejandro Camacho Cruz

SECRETARIO: María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso

1er. SUPLENTE: Ruth Edith Martín Fuentes

2° SUPLENTE: Daniel Ramos Pérez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Micología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. FM/DI/133/2017.

Instituciones colaboradoras: Laboratorio de Micología y Parasitología del Instituto Nacional de Pediatría.

ASESOR DEL TEMA:

María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso

SUSTENTANTE:

Fernando Torres Santander

Agradecimientos

Se extiende un agradecimiento a la QBP María Olivia Sotelo Reséndiz, a la Biol. Marlene Luengas Bautista y a la QFB Mónica Mirabal García del Laboratorio de Parasitología y Micología del Instituto Nacional de Pediatría por el apoyo y las facilidades brindadas para llevar a cabo el presente proyecto.

A la Unidad de Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo académico e infraestructura para el desarrollo del presente trabajo.

A la M en C Jamie Zabicky por el apoyo técnico y académico en la identificación molecular de los aislados incluidos en el presente estudio.

A la Dra. Patricia Manzano Gayosso por su total apoyo, paciencia y confianza para la realización del presente proyecto.

Índice

| | |
|---|----|
| I. Introducción..... | 1 |
| I.1 Género <i>Candida</i> | 1 |
| I.2 Candidosis..... | 3 |
| I.2.1 Antecedentes históricos..... | 3 |
| I.2.2 Agentes etiológicos..... | 3 |
| I.2.2.1 <i>Candida guilliermondii</i> | 5 |
| I.2.2.1.1 Hábitat y fuente de infección..... | 6 |
| I.2.2.1.2 Distribución geográfica..... | 7 |
| I.2.2.1.3 Edad y género..... | 7 |
| I.2.3 Factores de virulencia..... | 7 |
| I.2.4 Factores de riesgo..... | 9 |
| I.2.5 Formas clínicas..... | 11 |
| I.2.5.1 Candidosis hematógena..... | 14 |
| I.2.5.1.1 Sintomatología..... | 14 |
| I.2.5.1.2 Diagnóstico..... | 17 |
| I.2.5.1.3 Aislamiento de <i>Candida</i> spp..... | 19 |
| I.2.5.1.3.1 Medios de cultivo..... | 20 |
| I.2.5.1.4 Diferentes criterios de identificación de <i>Candida</i> spp..... | 24 |
| I.2.5.1.4.1 Identificación por criterio morfológico..... | 24 |
| I.2.5.1.4.1.1 Morfología macroscópica..... | 24 |
| I.2.5.1.4.1.2 Morfología microscópica..... | 25 |
| I.2.5.1.4.2 Identificación por los criterios bioquímicos..... | 25 |
| I.2.5.1.4.2.1 Medios cromogénicos..... | 26 |

| | |
|---|----|
| I.2.5.1.4.2.2 Zimogramas..... | 26 |
| I.2.5.1.4.2.3 Auxonogramas..... | 26 |
| I.2.5.1.4.3 Identificación por los criterios inmunológicos..... | 27 |
| I.2.5.1.4.4 Identificación por los criterios genéticos..... | 28 |
| I.2.5.1.4.5 Espectrometría de masas..... | 29 |
| I.2.5.1.5 Epidemiología..... | 30 |
| I.2.5.1.5.1 Epidemiología en México..... | 31 |
| I.2.5.1.6 Tratamiento..... | 33 |
| I.2.5.1.6.1 Terapia empírica..... | 34 |
| I.2.5.1.6.2 Terapia para candidemia confirmada..... | 34 |
| I.3 Estructura y mecanismo de acción de los antifúngicos..... | 35 |
| I.3.1 Inhibidores de la síntesis de ergosterol..... | 37 |
| I.3.2 Desestabilizadores de membrana fúngica..... | 37 |
| I.3.3 Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos..... | 39 |
| I.3.4 Inhibidores de la síntesis de pared fúngica..... | 39 |
| I.4 Evaluación del patrón de sensibilidad..... | 40 |
| I.4.1 Clasificación de las pruebas de sensibilidad | 40 |
| I.4.1.1 Métodos cualitativos y semicuantitativos..... | 41 |
| I.4.1.1.1 Método de difusión en disco..... | 41 |
| I.4.1.2 Métodos cuantitativos..... | 42 |
| I.4.1.2.1 Método de microdilución en caldo..... | 42 |
| I.4.1.2.2 Métodos de macrodilución en caldo..... | 44 |
| I.4.1.3 Métodos comerciales..... | 45 |
| II. Planteamiento del problema..... | 48 |
| III. Hipótesis..... | 50 |

| | |
|--|----|
| IV. Objetivos..... | 51 |
| IV.1 Objetivo general..... | 51 |
| IV.2 Objetivos particulares..... | 51 |
| V. Metodología..... | 52 |
| V.1 Aislados..... | 52 |
| V.2 Identificación..... | 53 |
| V.2.1 Identificación fenotípica..... | 53 |
| V.2.1.1 Identificación mediante criterios bioquímicos..... | 53 |
| V.2.1.2 Crecimiento en presencia de cicloheximida..... | 54 |
| V.2.1.3 Formación de pseudohifas..... | 54 |
| V.2.2 Identificación molecular..... | 54 |
| V.2.2.1 Extracción de ADN..... | 55 |
| V.2.2.2 Identificación de <i>Candida</i> spp. por PCR (ITS1- 5.8S – ITS2)..... | 55 |
| V.2.2.3 Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción..... | 56 |
| V.3 Prueba de sensibilidad a los antifúngicos..... | 58 |
| V.3.1 Microdilución en caldo para levaduras..... | 58 |
| V.3.2 Microdilución en caldo (SENSITITRE YeastOne®)..... | 60 |
| V.4 Análisis estadístico..... | 61 |
| VI. Resultados..... | 62 |
| VI.1 Pacientes..... | 62 |
| VI.2 Identificación..... | 64 |
| VI.2.1 Identificación fenotípica..... | 64 |
| VI.2.2 Identificación molecular..... | 70 |
| VI.3 Prueba de sensibilidad a los antifúngicos..... | 73 |
| VII. Discusión..... | 84 |

| | |
|----------------------------|----|
| VIII. Conclusiones..... | 91 |
| IX. Abreviaturas..... | 92 |
| X. Anexos..... | 94 |
| X.1 Medios de cultivo..... | 94 |
| XI. Bibliografía..... | 99 |

I. Introducción

I.1 Género *Candida*

Las especies del género *Candida* son microorganismos eucariontes, unicelulares, mesófilos, aerobios y carecen de pigmentos melánicos y/o carotenoides. Las células levaduriformes poseen varios organelos como mitocondrias, ribosomas, lisosomas, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, peroxisomas y dictiosomas o cuerpos cisternales, los cuales derivan en microvesículas o macrovesículas (Figura 1)⁶⁶.

La pared celular constituye aproximadamente el 25 % de la masa celular, está formada principalmente por quitina (N-acetilglucosamina), mananas y dos tipos de β -glucanas quienes le dan rigidez. Además, posee glucopéptidos y manoproteínas que le confieren cierto grado de flexibilidad los cuáles son de importancia taxonómica y antigénica (Figura 1)^{66, 224}.

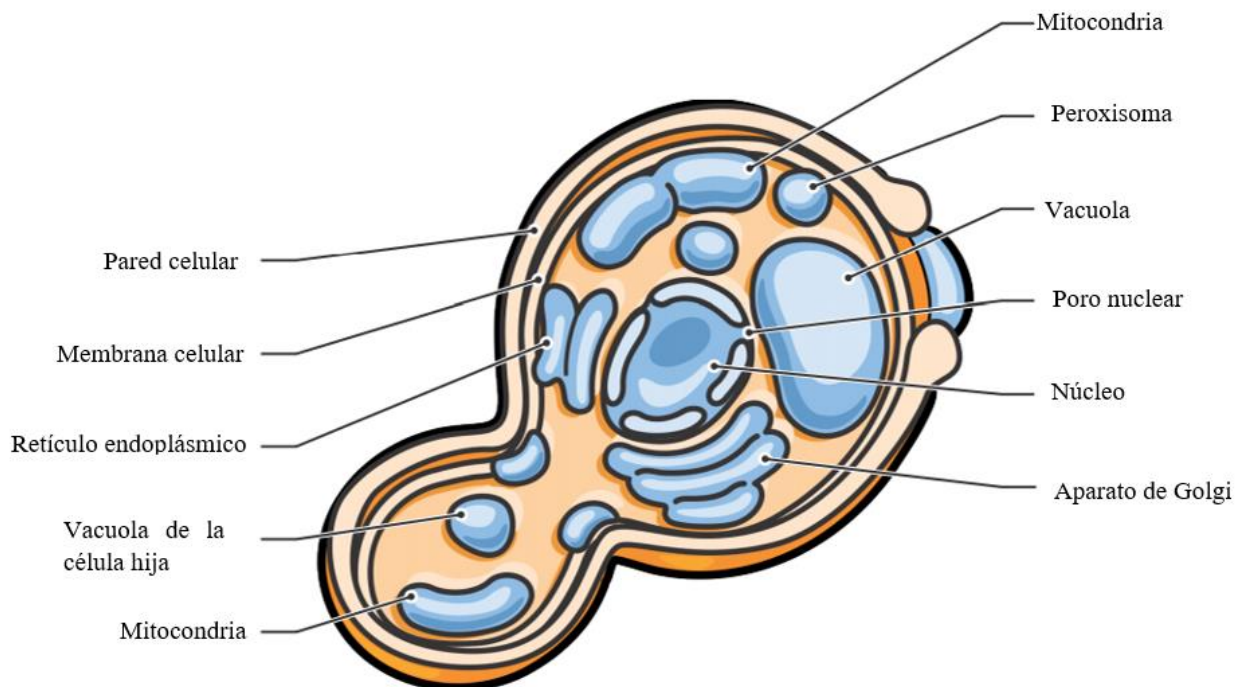


Figura 1. Anatomía celular de la levadura. Célula en anafase del proceso de gemación asexual (mitosis). Tomada y modificada de <http://www.taylorcustom.com/>²¹⁰.

La membrana celular está constituida por una bicapa lipídica que alberga proteínas que sirven como anclajes citoesqueléticos y enzimas para la síntesis de la pared celular, la transducción de señales y el transporte; además, contiene gran cantidad de esteroides, en especial ergosterol, sustancia diana para algunos antifúngicos (polienos y azoles). La

pared y membrana celular presentan cambios estructurales y funcionales de acuerdo con las condiciones de crecimiento a las que la levadura sea expuesta (Figura 1)⁶⁶.

La forma de las células es variable: elíptica, globosa, cilíndrica y ovoide; su tamaño varía dependiendo de la especie, oscila de $2 \text{ a } 7 \times 3 \text{ a } 8 \text{ }\mu\text{m}$, además tienen la capacidad de formar pseudohifas (con excepción de *C. glabrata*). La pseudohifa se forma a partir de los blastoconidios que permanecen unidos a la célula madre, se alargan y se separan entre ellos por constricciones en la unión de los septos hasta dar origen a cadenas ramificadas similar a la hifa (Figura 2)^{22, 28, 208}.



Figura 2. Pseudohifas. Blastoconidios alargados, unidos a la célula madre y separados por constricciones, formando una cadena parcialmente ramificada.

Las levaduras del género *Candida* se pueden reproducir mediante dos fases, la fase asexual también llamada anamórfica, la cual es mediante blastoconidios o gemación holoblástica y la fase sexual también conocida como teleomórfica. Existen levaduras que tiene solamente la reproducción anamórfica y otras que tienen la capacidad de reproducirse por las dos fases^{2, 28}.

I.2 Candidosis

La candidosis es una micosis oportunista de origen endógeno y raramente exógeno, de evolución aguda, subaguda o crónica causada por levaduras del género *Candida*. Las manifestaciones clínicas son variables, afecta principalmente a mucosas (boca, vagina, etc.), piel, uñas y de manera excepcional otros órganos como pulmones, corazón, riñones e incluso puede causar fungemias²⁸.

I.2.1 Antecedentes históricos

La candidosis fue descrita desde la antigua Grecia; Hipócrates, en su obra *Epidemics* alrededor del año 400 a.C., describió la presencia de placas blanquecinas en niños recién nacidos y en pacientes debilitados, a lo que le llamó “estomatitis aftosa”^{9, 22}.

Mucho tiempo después, en 1837 Parrot y Trousseau, reconocieron la candidosis de localización bucal como consecuencia de enfermedades o factores locales preexistentes; lo cual, estableció a la micosis como una infección oportunista debido a que requería la presencia de diversos factores de riesgo^{122, 220}.

Más tarde, en 1839, Langenbeck realizó el descubrimiento del organismo causal de la candidosis bucal, comúnmente denominada como *muguet*, al aislar un hongo en la boca de un paciente con aftas, y posteriormente Berg en 1846 establece la relación causa-efecto entre el hongo y las lesiones bucales^{122, 220}.

A lo largo de los años, la clasificación de este microorganismo ha pasado por diversos géneros y especies, en 1847, el microorganismo fue clasificado por Gruby como *Sporotrichum* y ubicado por Robin en el género *Oidium* (*O. albicans*), quien además describió la candidosis sistémica. Más tarde se confunde con *Monilia candida*, aislada de vegetales en descomposición. En 1923, la botánica Christine Marie Berkhout en su tesis doctoral en la Universidad de Utrech en Países Bajos, describió por primera vez al género *Candida* y finalmente en 1932 con los trabajos de Langeron y Talice, el microorganismo quedó clasificado en el género *Candida*^{22, 220}.

I.2.2 Agentes etiológicos

El género *Candida* incluye aproximadamente 150 especies heterogéneas; sin embargo, aproximadamente el 65% de las especies de *Candida* no poseen la capacidad

de crecer a 37 °C, lo cual impide que sean patógenas exitosas o comensales de humanos, por lo que solo una minoría han sido clasificadas con la capacidad de generar alguna forma de candidosis²⁸. En el Cuadro 1 se presenta la clasificación de las 18 especies más frecuentes causantes de infección.

Cuadro 1. Especies del género *Candida* de importancia médica. Tomado de Calderone, 2012²⁸.

| Frecuencia | Especie |
|-------------|--------------------------|
| Común | <i>C. albicans</i> |
| | <i>C. glabrata</i> |
| | <i>C. parapsilosis</i> |
| | <i>C. tropicalis</i> |
| Infrecuente | <i>C. krusei</i> |
| | <i>C. dubliniensis</i> |
| | <i>C. guilliermondii</i> |
| | <i>C. lusitaniae</i> |
| | <i>C. rugosa</i> |
| | <i>C. orthopsilosis</i> |
| | <i>C. metapsilosis</i> |
| Rara | <i>C. famata</i> |
| | <i>C. inconspicua</i> |
| | <i>C. kefyr</i> |
| | <i>C. lipolytica</i> |
| | <i>C. norvegensis</i> |
| | <i>C. zake</i> |
| | <i>C. zeylanoides</i> |

Las especies de mayor frecuencia son *Candida albicans* entre el 40 al 85 %, seguida por *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa* y *C. guilliermondii*^{28, 217}.

Para los fines del presente trabajo se ampliará la información de la especie *C. guilliermondii*, debido a que es el objeto del presente estudio.

1.2.2.1 *Candida guilliermondii* (Castellani) Langeron & Guerra 1938

Candida guilliermondii (*Pichia guilliermondii* hasta 2010, actualmente *Meyerozyma guilliermondii*, fase teleomórfica por Kurtzman y Suzuki¹⁰²) es un ascomiceto, del orden de los Saccharomycetales. Ésta fue descrita por primera vez por Castellani a principio del siglo XX como *Endomyces guilliermondii*; aislada en Sri Lanka de pacientes con micosis pulmonar^{36, 125, 151}.

La clasificación taxonómica de *C. guilliermondii* de acuerdo con la publicación de Merz & Hay¹²⁵ es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Hemiascomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: Endomycetaceae

Género: *Candida*

Especie: *C. guilliermondii*

Candida guilliermondii presenta células ovoides de 3 a 5 μm ; son mesófilas, es decir, crecen desde los 25 °C hasta los 45°C. Además, tiene la capacidad de formar pseudohifas^{29, 104, 170}.

Candida guilliermondii es un complejo heterogéneo que comprende varias especies, de las cuáles tres han sido reportadas como patógenas para el humano (*C. guilliermondii sensu stricto* [*Meyerozyma guilliermondii*, fase teleomórfica], *C. fermentati* [*M. caribbica*, fase teleomórfica] y *C. carpophila*)¹²⁰.

Un complejo de especies es un grupo de especies taxonómicamente relacionadas que son muy similares en apariencia, indistinguibles por métodos fenotípicos tradicionales y han sido asignadas como una sola especie. Sin embargo, son especies distintas y se distinguen comúnmente por técnicas de biología molecular^{25, 214}.

En la figura 3 se muestra el árbol filogenético del complejo de *C. guilliermondii* basado en el análisis de máxima parsimonia de las secuencias del gen de ARNr D1 / D2 LSU¹⁰².

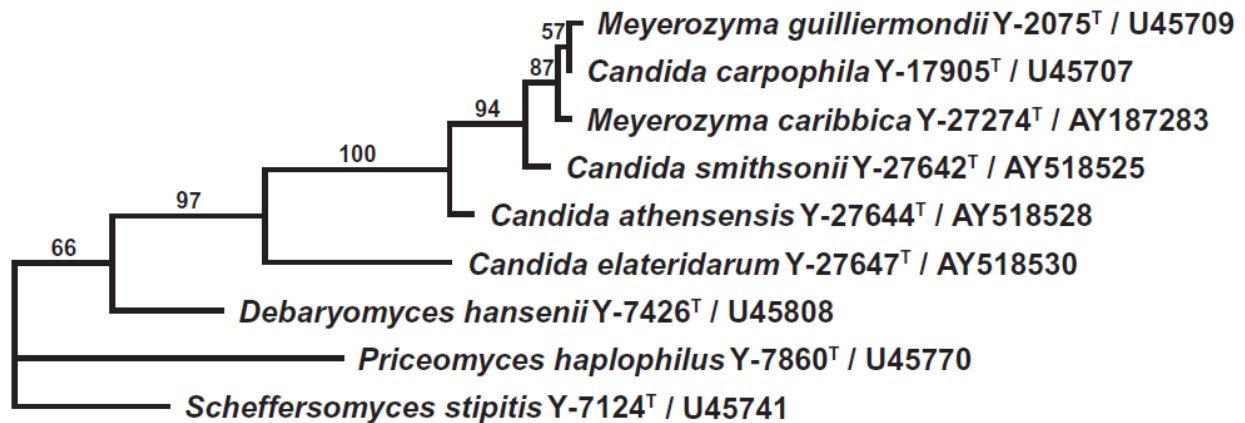


Figura 3. Árbol filogenético basado en el análisis de máxima parsimonia de las secuencias del gen de ARNr D1 / D2 LSU que representa la similitud de las especies que conforman al complejo de especies de *C. guilliermondii*. Tomado de Kutzman, 2011¹⁰².

I. 2.2.1.1 Hábitat y fuente de infección

Candida guilliermondii es una levadura ampliamente distribuida en la naturaleza, es aislada frecuentemente del suelo, plantas, árboles, insectos, agua de mar, la atmósfera y de alimentos procesados; además forma parte de la microbiota del ser humano, se aísla con frecuencia de la piel y de diversas mucosas de individuos sanos^{39, 154, 171}.

La fuente de infección de la candidosis, en la gran mayoría de los casos tiene un origen endógeno, casi siempre atribuible a dos procesos: el desequilibrio de la microbiota, que favorece la colonización por levaduras del género *Candida*, lo cual puede ser secundario a los cambios en el pH, acumulación de nutrientes como el glucógeno, o la disminución de la biota bacteriana por la administración de antibióticos de amplio espectro; o bien debido a enfermedades o procesos que influyan en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular, por ejemplo defectos en el número o función de leucocitos polimorfonucleares y linfocitos T y B^{22, 72, 157}.

En otras ocasiones la fuente de infección puede ser exógena, las levaduras pueden ingresar al torrente sanguíneo por penetración directa a los tejidos epiteliales, debido al daño de las barreras en el cuerpo causadas por cirugía, politraumatismos, tratamiento farmacológico administrado a través de catéteres o pueden propagarse a partir de la formación de biopelículas en las superficies de los dispositivos médicos¹⁵⁸.

I. 2.2.1.2 Distribución geográfica.

Debido a que *Candida guilliermondii* es una levadura que forma parte de la microbiota del ser humano, la distribución geográfica de este microorganismo es mundial, por lo que esta patología se le considera una micosis cosmopolita con diferencia en la frecuencia dependiendo del país y de la forma clínica¹⁷⁰.

I. 2.2.1.3 Edad y género

En general, la candidosis afecta por igual al hombre y a la mujer; sin embargo, cuando la topografía clínica se localiza en el sistema urogenital es más frecuente en la mujer debido a la afectación de la mucosa vaginal^{180, 204}.

La candidosis se presenta a cualquier edad, pero en los extremos de la vida es más común. En los neonatos al exponerse durante su paso por el canal de parto y en la vejez debido a las enfermedades concomitantes^{97, 217}.

I.2.3 Factores de virulencia

Las levaduras del género *Candida* poseen distintas estrategias que le permiten adquirir la característica de microorganismo patógeno y causar infección, las cuales son conocidas como factores de virulencia; éstos actúan de manera coordinada para otorgarle al microorganismo la posibilidad de sobrevivir en tejidos donde comúnmente no es comensal y evadir la respuesta inmune del hospedero^{5, 225}. En *C. guilliermondii* son pocos los estudios sobre factores de virulencia.

Entre los factores de virulencia de mayor relevancia en *Candida* spp. son los siguientes:

1. Adaptación al pH. Las diferentes especies del género *Candida* tienen la capacidad de soportar los cambios de pH en el medio, esta característica está regulada por dos genes, *PHR1* y *PHR2*. El primero se activa en pH neutro o ligeramente básico (cuando este microorganismo está en sangre o piel alcalinizada) y se inactiva en pH ácido, activándose entonces *PHR2* (por ejemplo, en vagina)^{53, 217}.

2. Adhesinas. Las adhesinas son una serie de proteínas que le permiten a las levaduras del género *Candida* adherirse o anclarse a los distintos tejidos del hospedero, lo cual resulta esencial para el establecimiento de la infección²²⁵. Entre las adhesinas de

mayor importancia encontramos a las proteínas de secuencia tipo aglutinina (ALS) que son proteínas glicosiladas²⁹, entre las que destacan *Als1p* y *Als5p* que tienen la función de adherencia a las células epiteliales bucales y a la fibronectina, respectivamente⁹⁰. Otra proteína de relevancia es *Hpw1* la cual funciona como adhesina del tubo germinativo al tejido epitelial²⁰⁷.

Otro factor de importancia relacionado con la adhesión de las levaduras a las distintas superficies es la hidrofobicidad relativa de la superficie celular (CSH), que es una propiedad de la pared celular. *Candida guilliermondii* es una de las especies con menor CSH⁵⁰.

3. Secreción de proteinasas. Las proteinasas son enzimas cuya función es la degradación de distintos sustratos; en las especies de *Candida* se han descrito diferentes tipos de estas enzimas, entre las que destacan las aspartil proteinasas secretadas (SAPs) las cuales degradan varias proteínas humanas en los sitios de lesión, tales como la albúmina, la hemoglobina, la queratina y la inmunoglobulina A⁹², a la fecha se han descrito 9 tipos de aspartil proteinasas secretadas (SAP 1-9) las cuales se ha puntualizado que además de la función degradativa, también favorecen la adhesión de las levaduras a los distintos tejidos del hospedero y por tanto la diseminación de la infección¹⁹⁵. En *C. guilliermondii* se detectó la expresión de SAPs en un aislado obtenido de un paciente VIH con candidosis. Los autores demostraron la capacidad de la enzima para hidrolizar algunos componentes de la matriz extracelular (fibronectina, laminina). Esta aspartil proteinasa exocelular es fundamental para facilitar la diseminación de la levadura a diferentes órganos⁵⁸.

Las fosfolipasas son otro grupo de proteinasas de importancia, las cuales se han clasificado de acuerdo con el tipo de enlace éster que tienen la capacidad de escindir; fosfolipasas A, B, C o D, siendo la fosfolipasa B la que tiene mayor actividad enzimática¹³⁴. Diversos autores han descrito la producción de fosfolipasas en algunos aislados de *C. guilliermondii*¹³⁰; sin embargo, la gran mayoría de estudios coinciden en que dicha habilidad no es propia de esta especie^{50, 175}.

4. Transición morfológica. La habilidad de cambiar entre la forma levaduriforme y la formación de pseudohifas, es uno de los factores de virulencia de mayor relevancia para el género *Candida*. Esta transformación, de acuerdo con diversos autores, es lo que

marca la transformación de este microorganismo en patógeno²². Además, la formación de pseudohifas por *C. guilliermondii* está relacionada con el incremento en la resistencia a antifúngicos¹⁰⁴.

5. *Switching* fenotípico. Es la habilidad que poseen las distintas especies del género *Candida* para cambiar su expresión fenotípica; por ejemplo, en la morfología colonial que presenta, la cual se puede observar como lisa, rugosa, estrellada o punteada, al igual que en la coloración de esta que puede ser blanca u opaca. Asimismo, también tienen la capacidad para realizar cambios en la antigenicidad, como aumento o disminución en la producción de enzimas y toxinas^{22, 203}. Aislados de *C. guilliermondii* crecidos en agar con sulfato de cobre (CuSO₄) poseen la capacidad de cambiar de manera espontánea y reversible entre dos fenotipos distinguibles: colonias blancas y marrón. Esta habilidad está íntimamente relacionada con el desarrollo de pseudohifas y por tanto con resistencia antifúngica¹⁰⁴.

6. Formación de biopelículas. Una biopelícula es una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie biótica o abiótica que permanecen unidos con fuerza por una matriz extracelular de naturaleza polimérica excretadas por ellos mismo^{45, 149}. Se ha descrito que distintas especies de *Candida*, especialmente *C. albicans* y *C. parapsilosis*, tienen la habilidad de formar estas estructuras; las biopelículas les confiere alta capacidad defensiva, persistencia y mayor resistencia a los antifúngicos^{59, 101}. Algunos autores han demostrado que la formación de biopelículas por *C. guilliermondii* son de baja actividad metabólica y moderada formación de biomasa¹²⁰.

1.2.4 Factores de riesgo

La candidosis se clasifica como una micosis oportunista, es decir, para que las diferentes especies de *Candida* puedan cambiar su naturaleza comensal a patógena, es fundamental que el hospedero presente uno o más factores predisponentes o de riesgo que ocasione un estado de inmunosupresión y cambios en el microambiente, lo cual lleva un aumento en el número de levaduras y la invasión a los tejidos (Cuadro 2)^{38, 114}.

Cuadro 2. Principales factores de riesgo y el posible efecto que contribuye al desarrollo de las distintas formas clínicas de la candidosis^{20, 21, 22, 38, 61, 107, 156, 213, 217, 227}.

| Origen | Factor de riesgo | Efecto |
|---|--|--|
| Enfermedades debilitantes | Diabetes mellitus | Inmunosupresión |
| | Tuberculosis | |
| | Absceso hepático amebiano | |
| | Hepatitis | |
| Procesos debilitantes | Prematurez | Inmunosupresión |
| | Embarazo | |
| | Senectud | |
| | Desnutrición | |
| Trasplantes ^a | Renal | Inmunosupresión Acceso directo vascular |
| | Hepático | |
| | Corazón | |
| | Médula ósea | |
| Inmunodeficiencias primarias o adquiridas ^b | Leucemia aguda o crónica | Inmunosupresión |
| | Neutropenia (polimorfonucleares <500 mm ³) | |
| | Leucemia linfoblástica o mieloblástica | |
| | Linfomas | |
| | Enfermedad de Hodgkin | |
| | Sarcomas | |
| | Agammaglobulinemias | |
| | Síndrome de Di George | |
| | Síndrome de Cushing | |
| | VIH – SIDA | |

| Origen | Factor de riesgo | Efecto |
|------------------------------|---|-------------------------|
| Factores iatrogénicos | Quimioterapia | Inmunosupresión |
| | Corticoterapia | |
| | Tratamientos prolongados con antibióticos | Colonización fúngica |
| | Tratamiento con fármacos antiulcerosos | |
| | Cateterismo | Acceso directo vascular |
| Nutrición parenteral | Producto contaminado | |
| Misceláneo | Drogadicción | Inmunosupresión |
| | Quemaduras | |
| | Traumatismos | Vía de inoculación |
| | Cirugías | |
| | Cambios de pH | |
| | Dermatosis previas | Colonización fúngica |
| | Prótesis dentarias | |
| Factores ocupacionales | | |

^a Sobresalen aquellos con gran manipulación quirúrgica, además del empleo de potentes inmunosupresores para evitar el rechazo del órgano trasplantado. ^b Son de relevancia aquellas que comprometen o debilitan la inmunidad celular.

1.2.5. Formas clínicas

La candidosis es una de las micosis más frecuente y polimórfica que afecta al ser humano, el nivel de profundidad o severidad va a depender del factor predisponente con el que se asocie²²; cada una de las formas clínicas de las candidosis tienen factores de riesgo relacionados; por ejemplo, en las candidemias tres son los factores de mayor relevancia: 1) la aplicación de catéteres; 2) el uso de alimentación parenteral y 3) el tratamiento con antibióticos de amplio espectro^{38, 212, 221}, en el Cuadro 3 se muestran las formas clínicas de la candidosis y sus principales factores de riesgo o predisposición.

Candida guilliermondii es considerada como especie emergente, debido a que en los últimos años ha representado un aumento significativo en la frecuencia como agente

etiológico de fungemia, osteomielitis, peritonitis, artritis séptica, candiduria, endocarditis, onicomicosis y candidosis cutánea^{39, 164,170}.

Cuadro 3. Formas clínicas de la candidosis y principales factores de riesgo asociados. Tomada de Anaissie, 2009⁵.

| Forma clínica | Factores de riesgo |
|------------------------|---|
| Hematógena | <p>Colonización: uso perenne de antibióticos de amplio espectro y estancia hospitalaria prolongada.</p> <p>Interrupción de la integridad intestinal: cirugía abdominal, nutrición parenteral.</p> <p>Inmunosupresión sistémica: extremos de la vida, desnutrición, terapia inmunosupresora, neutropenia, trasplante de células madre y órganos, VIH – SIDA con bajo recuento de células CD4, falla renal/hemodiálisis, diabetes mellitus, quemaduras de tercer grado.</p> |
| Tracto urinario | <p>Inmunosupresión sistémica: diabetes mellitus</p> <p>Factores locales: catéter urinario permanente, obstrucción urinaria, procedimientos en el tracto urinario</p> |
| Orofaringea | <p>Inmunosupresión sistémica: (las mismas que candidosis hematógena)</p> <p>Inmunosupresión local: radioterapia para el cáncer de cabeza y cuello, uso de corticoesteroides inhalados.</p> <p>Factores locales: dentaduras postizas (mal ajustadas o en mal estado).</p> |
| Esofágica | <p>Inmunosupresión sistémica: (las mismas que candidosis hematógena)</p> |
| Neumonía | <p>Aspiración</p> |

| Forma clínica | Factores de riesgo |
|---------------------------------|---|
| Vulvovaginal | <p>Colonización: uso de antibióticos de amplio espectro</p> <p>Inmunosupresión sistémica: VIH – SIDA, diabetes mellitus, uso de corticoesteroides sistémicos.</p> <p>Otros: anticonceptivos orales, embarazo</p> |
| Uñas y piel | <p>Factores locales: humedad y oclusión, inmersión de las manos en agua, enfermedad vascular periférica</p> |
| Cutánea congénita | <p>Inmunosupresión: prematurez</p> <p>Factores locales: madre con cuerpo extraño intrauterino</p> |
| Mucocutánea crónica | <p>Inmunosupresión: defectos en los linfocitos T</p> |
| Pericarditis | <p>Inmunosupresión sistémica: (las mismas que candidosis hematológica).</p> <p>Cirugía torácica</p> |
| Endocarditis | <p>Factores locales: cirugía mayor, antecedentes de endocarditis bacteriana o enfermedad vascular, presencia de válvula prostética o catéter venoso central a largo plazo.</p> <p>Otro: abuso de drogas intravenosas.</p> |
| Sistema nervioso central | <p>Inoculación directa: cirugía en el sistema nervioso central, derivación ventrículo peritoneal.</p> |

| Forma clínica | Factores de riesgo |
|-----------------------------|--|
| Ocular | Inoculación directa: cirugía ocular o trauma |
| Hueso y articulación | Inoculación directa: cirugía, trauma o inyecciones intraarticulares. |
| Abdominal | Factores locales: trasplante de órgano sólido, perforación recurrente, cirugía abdominal repetida, fugas anastomóticas, pancreatitis, diálisis peritoneal ambulatoria continua. Inmunosupresión sistémica: trasplante de órganos sólidos. |

Para los fines del presente trabajo, se describirá ampliamente la forma hematológica también conocida como candidemia, debido a que es el objeto del estudio.

I.2.5.1 Candidosis hematológica

La candidosis hematológica o candidemia, es el resultado de la presencia y colonización de levaduras en el torrente sanguíneo. En esta forma clínica la levadura podría extenderse y dar como resultado una candidosis diseminada aguda, candidosis diseminada crónica o candidosis profunda o sistémica (diseminada a otros órganos y/o sistemas) dependiendo de las condiciones del paciente y la rapidez del diagnóstico^{5, 8, 52}.

En general se presenta en pacientes con múltiples factores de inmunosupresión (Cuadro 3), hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (UCI) y principalmente en prematuros con catéter venoso central (CVC)^{19, 21, 113}.

I.2.5.1.1 Sintomatología

La sintomatología que presentan los pacientes con candidosis hematológica es inespecífica y se llega a confundir con septicemias bacterianas. Los pacientes cursan con fiebre y escalofríos, en ocasiones se asocia con una erupción maculopapular con tendencia hemorrágica, o bien erupción papular perifolicular^{22, 154, 202}.

La sintomatología también se ha relacionado con la especie de *Candida* causante de la infección, en el Cuadro 4 se muestran algunos casos clínicos publicados por diversos autores. De los 15 casos descritos más de la mitad de los pacientes presentaron una buena respuesta al tratamiento. Los cinco pacientes con candidemia por *C. guilliermondii* presentaron buena evolución clínica.

Cuadro 4. Casos clínicos de candidemia causados por *Candida* spp., descritos en diversos países.

| País | No. de pacientes | Edad | Factores predisponentes | Otras manifestaciones | Evolución | Especie | Autor |
|------------|------------------|-----------------|---|---|----------------------------|---|-------------------|
| Inglaterra | 3 | 18 | Leucemia y quimioterapia | Erupciones maculopapulares ligeramente hemorrágicas | Fallecimiento | <i>C. albicans</i> | Slater, 1982 |
| | | 20 | Anemia y leucemia. | | Fallecimiento | | |
| | | 60 | Linfoma | | Fallecimiento | | |
| Malasia | 1 | 63 | Neutropenia | Fiebre | Fallecimiento | <i>C. auris</i> <i>C. tropicalis</i> | Mohd Tap, 2018 |
| China | 1 | 82 | Nutrición parenteral y colocación de CVC. | - | Fallecimiento | <i>C. parapsilosis</i> | Zhang, 2015 |
| Brasil | 5 | RN ^a | Nutrición parenteral | Fiebre | Curación | <i>C. guilliermondii</i> | Pasqualotto, 2006 |
| | | 45 | Catéter | | Curación | | |
| | | 6 | Leucemia y quimioterapia | | Curación | | |
| | | 73 | - | | Curación | | |
| | | 45 | Catéter | | Curación | | |
| Brasil | 3 | RN ^a | Nutrición parenteral, antibioticoterapia, prematuridad y catéter. | - | Curación | <i>C. krusei</i> | Amaral, 2012 |
| | | RN ^a | Antibioticoterapia, catéter, prematuridad y cirugía. | | Curación | | |
| | | RN ^a | Antibioticoterapia, catéter, prematuridad y cirugía. | | Curación | | |
| España | 1 | 40 | Antibioticoterapia, catéter, y nutrición parenteral. | Fiebre | Curación | <i>C. glabrata</i> | Angel, 2005 |
| EUA | 1 | 82 | Malignidad, catéter, cirugía y nutrición parenteral. | - | Fallecimiento ^b | <i>C. lusitaniae</i> | Mishra, 2017 |

^a Recién nacido, ^b La muerte no fue atribuida a la candidosis hematogena por *C. lusitaniae*.

I.2.5.1.2 Diagnóstico

El diagnóstico de la candidosis hematológica con frecuencia se basa en una correlación de hallazgos clínicos y de laboratorio. Las características clínicas útiles en un paciente con sospecha de candidemia incluyen: fiebre sin evidencia de un foco infeccioso, astenia y lesiones cutáneas metastásicas (generalmente en hospederos neutropénicos). La exploración física completa del paciente es fundamental para la búsqueda de un origen de las lesiones cutáneas, lo cual ayudará a establecer los diagnósticos diferenciales atribuibles⁵.

El diagnóstico de laboratorio dependerá de dos enfoques: el inmunológico y el microbiológico. El enfoque inmunológico consiste en la realización de diversas técnicas para determinar la presencia del microorganismo o cuantificar la respuesta del hospedero al microorganismo⁵.

1. Intradermorreacción. Esta prueba se realiza a través de la aplicación intradérmica de candidina, la cual puede ser monovalente, únicamente antígeno de *C. albicans*, o polivalente, de diversas especies de *Candida*. Se aplica una décima del antígeno, a las 48 horas se realiza la lectura; si el eritema y la induración es mayor a 5 mm se considera positiva. Generalmente esta prueba se utiliza como parámetro para valorar el estado inmunológico del paciente¹¹².

2. Serología. Las técnicas más utilizadas son precipitación, fijación de complemento e inmunofluorescencia directa o indirecta. La utilidad es limitada por los cruces inmunológicos²².

3. Detección de mananos. Se realiza en suero y otros fluidos utilizando el método de *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) mediante el método comercial Platelia-Candida Ag[®] (BioRad), el cual tiene la capacidad de detectar mananos circulantes en sangre; sin embargo, esta prueba se considera de baja sensibilidad. La variante Platelia-Candida Ab[®] (BioRad) detecta anticuerpos antimamanos^{198, 199}.

4. Determinación de β -1,3-D-glucanos. Esta prueba detecta la presencia de β -1,3-D-glucanos, que es un componente de la pared celular de algunos hongos patógenos incluida *Candida*, empleando el método de ELISA mediante algún método comercial como Fungitell[®] BG assay (Cape Cod Inc). Esta prueba tiene la

capacidad de detectar y cuantificar la presencia de β -1,3-D-glucanos en el torrente sanguíneo con una sensibilidad y especificidad mayor al 90 %. Sin embargo, esta prueba puede dar resultados falsos negativos (debido a la presencia de hiperbilirrubinemia o hipertrigliceridemia) y resultados falsos positivos, los cuales pueden resultar del exceso de manipulación de la muestra y la exposición a gases u otros materiales que puedan contener glucanos, o en presencia de bacteremia Gram positiva, hemólisis, hemodiálisis con membranas de celulosa o terapia con inmunoglobulinas IV y albúmina^{57, 169}.

Existen otras pruebas como: 1) La detección de DNA de las diversas especies de *Candida* mediante el uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés); sin embargo, su uso para diagnóstico está limitado por la falta de estandarización de protocolos y por su validación clínica limitada⁵. 2) La resonancia magnética con el panel de T2Candida[®] (T2 Biosystems)¹⁶⁸. Esta metodología está basada en partículas recubiertas con objetivos específicos (ADN, proteínas) que, cuando se agregan a una muestra que contiene el objetivo, se une y se agrupa en él; los cambios inducidos en el entorno acuoso de la muestra alteran la señal T2MR, lo que indica la presencia del objetivo y por tanto del microorganismo¹⁰³.

En el Cuadro 5 se describen la especificidad y sensibilidad de algunas de las técnicas descritas anteriormente.

Cuadro 5. Métodos de diagnóstico, especificidad y sensibilidad en el diagnóstico de candidemia. Tomado y modificado de Pfaller, 2016^{168, 169}.

| Método de diagnóstico | Especificidad | Sensibilidad |
|--|---------------|--------------|
| Determinación de β -1,3-D-glucanos | 77.2 % | 93.3 % |
| Detección de mananos | 97 % | 59 % |
| T2Candida [®] | 99.4 % | 91.1 % |
| PCR ^a | 70 % | 59 % |

^a Reacción en cadena de la polimerasa.

Estudios preclínicos han comparado el panel de *Candida* T2 con un sistema automatizado de cultivo de sangre, los cuales demostraron que el panel *Candida* T2 tiene la capacidad de detectar a las cinco especies principales de *Candida* y por tanto redujo el tiempo necesario para obtener un resultado positivo¹⁶⁸.

El enfoque microbiológico consiste en el aislamiento del microorganismo de muestras sanguíneas del paciente; el aislamiento de *Candida* de sangre requiere de un cultivo e incubación de un caldo primario (hemocultivo) para amplificar el bajo número de levaduras, después se pueden sembrar en otros medios para su aislamiento e identificación. El realizar un frotis y posterior tinción de Gram del hemocultivo positivo sería de utilidad para visualizar las levaduras. Los medios de hemocultivo bifásico y los frascos de cultivo ventilados son óptimos para promover el crecimiento de estos microorganismos, así como el pretratamiento de muestras de sangre mediante lisis celular y centrifugación aumenta en gran medida el rendimiento^{5, 49}.

Actualmente, se emplean sistemas automatizados con monitoreo continuo de los hemocultivos, tales como el BactT/Alert (BioMerieux) y Bactec® (Becton-Dickinson) los cuales ofrecen un tiempo promedio de detección de tres a cuatro días para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, y *C. tropicalis*, mientras que *C. krusei* y *C. glabrata* es más lento su crecimiento; por lo tanto, los hemocultivos obtenidos para descartar una candidosis hematogena deben evaluarse hasta dos semanas después de incubación^{116, 181}.

I.2.5.1.3 Aislamiento de *Candida* spp.

Candida albicans sigue siendo la especie predominante obtenida de muestras clínicas; sin embargo, en las últimas dos décadas se ha documentado aumento de las infecciones causadas por otras especies que presentan mayor resistencia a los diferentes antifúngicos, lo que justifica la importancia del aislamiento e identificación de las diversas especies⁷⁷. Además, el aislamiento permitiría identificar si una infección fúngica es causada por dos o más especies de *Candida*; de igual forma el aislamiento tiene el objetivo de eliminar cualquier contaminación bacteriana que pudiera estar presente¹³⁵.

I.2.5.1.3.1 Medios de cultivo

Las diversas especies de *Candida* pueden crecer en medios de cultivo habituales, como son: agar dextrosa Sabouraud, gelosa sangre e infusión de cerebro, corazón y extracto de levadura⁴⁹. Sin embargo, estos medios de cultivo no proporcionan un aislamiento certero, debido a que las características de las colonias de la mayoría de las especies de *Candida* son muy similares (colonias blanquecinas, lisas (en ocasiones rugosas), húmedas, limitadas y opacas) (Figura 4); crecen de 24 a 72 horas, a 28 °C o 37 °C, en ocasiones se puede observar hifas y pseudohifas dentro del agar^{77, 94}.



Figura 4. Morfología colonial de algunas especies de *Candida* en agar dextrosa Sabouraud. (A) *Candida albicans*, (B) *Candida tropicalis*, (C) *Candida krusei*, (D) *Candida glabrata*, (E) *Candida parapsilosis* y (F) *Candida guilliermondii*.

Sin embargo, existen otros medios de cultivo selectivos que permiten el aislamiento primario de *Candida* spp. y una identificación presuntiva; tal es el caso del *Bismuth Glucose Glycine Yeast Agar* (agar BiGGY) también conocido como agar Nickerson. Contiene citrato de amonio y bismuto, el cual actúa como un agente inhibidor del crecimiento bacteriano, así como sulfitos que son reducidos a sulfuros, por acción metabólica de las levaduras, resultando así colonias de color marrón claro u oscuro, lo que las hace distinguibles de otros hongos levaduriformes (Figura 5)^{138, 200, 226}.

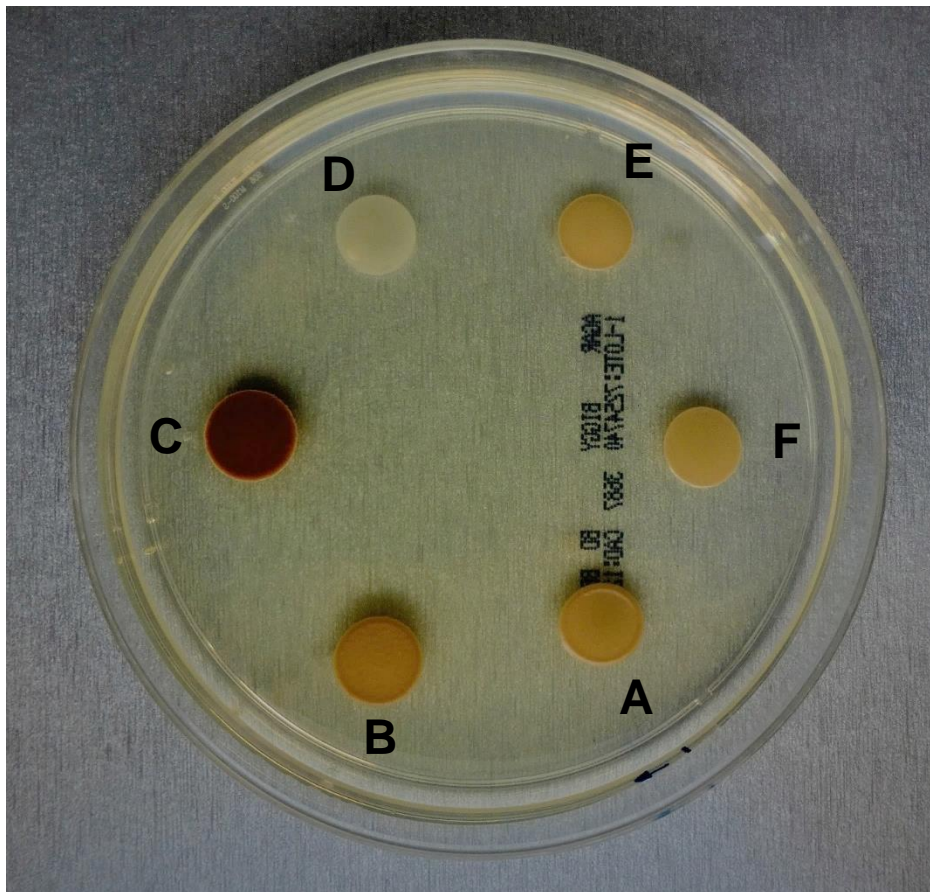


Figura 5. Morfología colonial de algunas especies de *Candida* en agar BiGGY. (A) *Candida albicans*, (B) *Candida tropicalis*, (C) *Candida krusei*, (D) *Candida glabrata*, (E) *Candida parapsilosis* y (F) *Candida guilliermondii*.

Otro de los medios selectivos que permiten el aislamiento primario y la identificación presuntiva son los medios cromogénicos y fluorogénicos, estos

medios ponen de manifiesto la actividad de enzimas específicas y la presencia de distintas especies presentes en los cultivos mixtos; tales medios son: agar molibdato^{27, 44}, *Yeast Medium Aniline Blue*⁸⁴, Fluoroplate® *Candida*^{117, 188}, MUAG, Candichrom²²³ y Candiselect®⁶⁹.

Sin embargo, dos son los medios de esta naturaleza que han destacado y que actualmente tienen un uso importante en laboratorios clínicos; uno de ellos, es el Albicans ID2® (bioMérieux) el cual contenía un sustrato cromogénico para la enzima hexosaminidasa además de cloranfenicol y gentamicina para la inhibición bacteriana. La hidrólisis de este sustrato, que es característica de *C. albicans*, produce colonias pigmentadas de color azul, mientras que las especies de *Candida* no-*albicans* permanecen blancas^{33, 226}. Albicans ID2® (bioMérieux) fue modificado a *Candida* ID2®, este medio tiene dos sustratos cromogénicos y produce colonias azules para *C. albicans*, colonias rosadas para *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. kefyr*, y blancas para el resto de las especies^{32, 82}.

El medio cromogénico más utilizado actualmente es el CHROMagar *Candida*®, con este medio se pueden identificar a las principales especies de *Candida* de interés clínico⁷⁷. De acuerdo con diversos estudios este medio resulta útil en la identificación presuntiva de cinco especies, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* (Cuadro 6)^{15, 69, 77, 159}; sin embargo, algunos autores ponen en duda su eficacia para la identificación de esta última^{146, 190}.

Existen estudios que afirman que mediante el uso de CHROMagar *Candida*® es posible la identificación de más especies del género *Candida* e incluso de otros géneros de levaduras, tomando en cuenta la coloración, morfología y aspecto de la colonia (Figura 6). García & cols. establecieron los parámetros para la identificación presuntiva de hasta 21 levaduras de diferentes géneros y especies⁷⁷. De acuerdo con diferentes autores no hay una característica distintiva para la identificación de *C. guilliermondii*^{100, 170}.

Cuadro 6. Identificación presuntiva de cinco especies de *Candida* en CHROMagar Candida®. Tomado y modificado de García, 1998^{5,77}.

| Especies de <i>Candida</i> | Coloración | Sensibilidad | Especificidad | Valor predictivo positivo |
|----------------------------|-------------------------|--------------|---------------|---------------------------|
| <i>C. albicans</i> | Verde esmeralda | 100 % | 100 % | 100 % |
| <i>C. glabrata</i> | Rosa morada | 97.3 % | 99.9 % | 97.4 5 |
| <i>C. krusei</i> | Malva (apariencia seca) | 92.3 % | 99.6 % | 92.6 % |
| <i>C. parapsilosis</i> | Blanca – rosa pálido | 90.2 % | 98.3 % | 91.1 % |
| <i>C. tropicalis</i> | Azul metálico | 100 % | 100 % | 100 % |

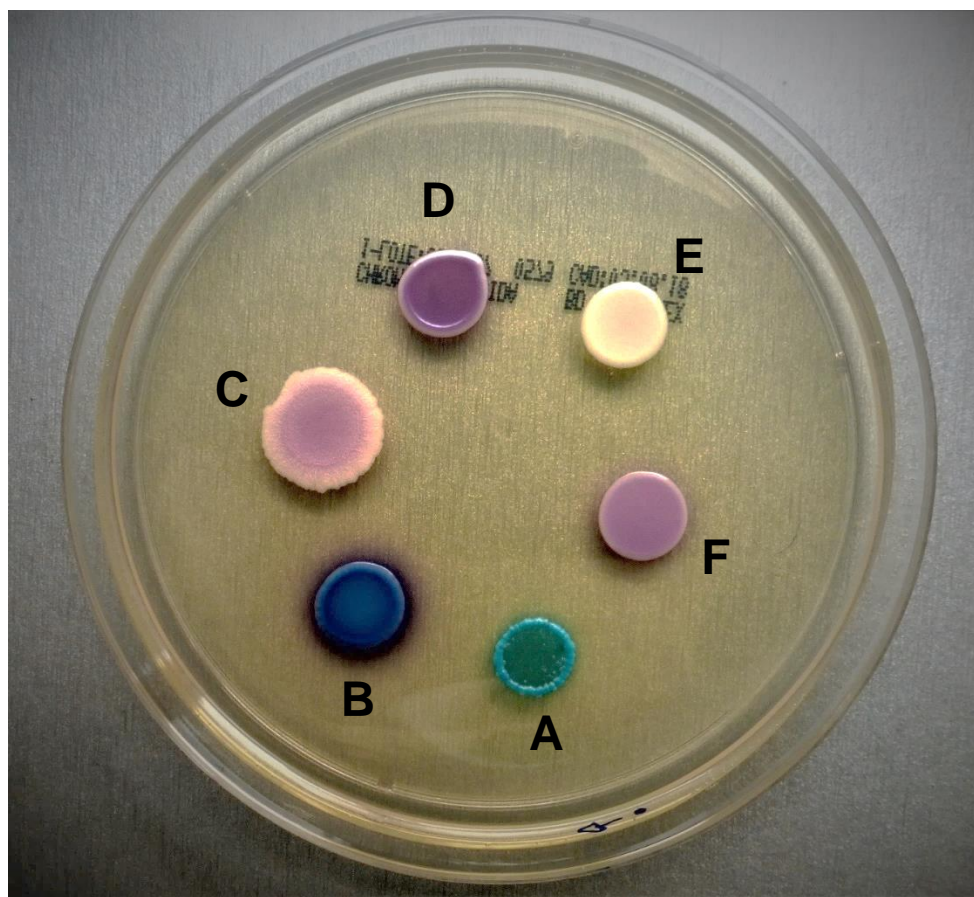


Figura 6. Morfología colonial de algunas especies de *Candida* en CHROMagar Candida®. (A) *Candida albicans*, (B) *Candida tropicalis*, (C) *Candida krusei*, (D) *Candida glabrata*, (E) *Candida parapsilosis* y (F) *Candida guilliermondii*.

I.2.5.1.4 Diferentes criterios de identificación de *Candida* spp.

La identificación de las distintas especies de *Candida* se puede llevar a cabo mediante cuatro criterios: morfológico, bioquímico, inmunológico y genético¹⁰⁸.

I.2.5.1.4.1 Identificación por criterio morfológico

I.2.5.1.4.1.1 Morfología macroscópica

Las colonias de las diversas especies de *Candida* en agar dextrosa Sabouraud o agar papa dextrosa son limitadas, planas, cremosas, opacas, lisas o rugosas, de color blanco o blanco amarillento. En algunas especies (*C. tropicalis* y *C. albicans*) es posible observar la formación de pseudohifas que se profundizan en el agar o forman halos filamentosos. El halo filamentoso es una característica morfológica de *C. tropicalis* después de las 72 horas (Figura 7). Sin embargo, este criterio resulta poco útil debido al gran parecido que pueden presentar entre sí las distintas especies²².

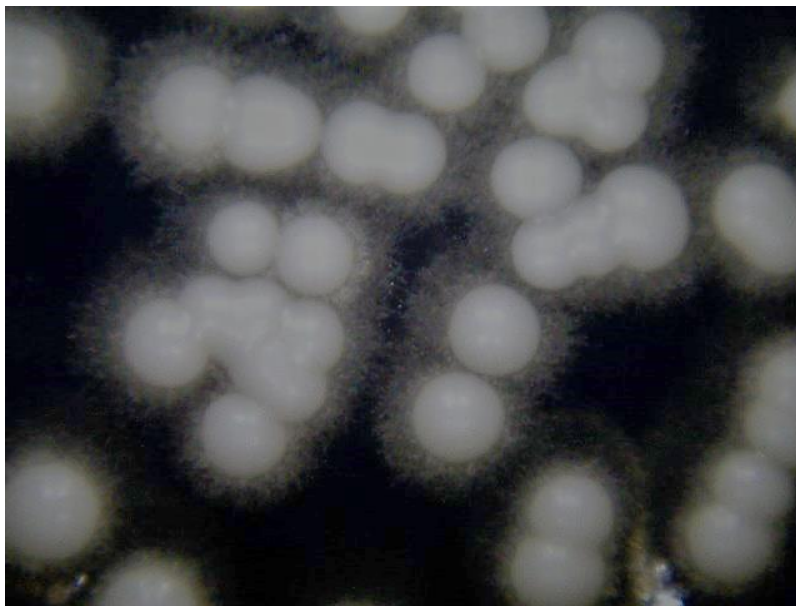


Figura 7. Morfología colonia de *Candida tropicalis* en agar dextrosa Sabouraud. Halo filamentoso formado posterior a las 72 horas de incubación.

Candida guilliermondii en agar dextrosa Sabouraud presenta colonias de color blanco o crema, son limitadas, planas, cremosas y brillantes^{9, 22}.

I.2.5.1.4.1.2 Morfología microscópica

1. Formación de tubo germinativo. Esta prueba se realiza en suero humano, sueros con glucosa, glucosamina o sales de amonio o agar Mueller Hinton; se siembra la levadura en los diferentes medios, se incuba a 37 °C durante dos horas, posteriormente se realiza un examen directo en el cual se observan tubos germinativos de entre 5 – 15 µm, la prueba es positiva y presuntiva para la identificación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*^{89, 115}.

2. Producción de pseudohifas y clamidoconidios. Esta prueba se realiza en medios bajos en nutrientes, como agar harina de maíz, agar harina de arroz o agar papa – zanahoria, a los que se les agrega 1 % de algún tensoactivo como el tween 80. Los aislados levaduriformes se siembran mediante la técnica de Dalmau, se incuban a 25 °C durante 72 horas, la lectura de las placas se realiza directamente bajo el microscopio. Todas las especies del género *Candida* tienen la capacidad de producir pseudohifas con excepción de *C. glabrata*; por lo que la ausencia de pseudohifas es presuntiva de esta especie^{22, 123}.

Las pseudohifas de *C. guilliermondii* se caracterizan por ser poco abundantes y cortas, además pueden desarrollarse en cadenas pequeñas o en racimos. Esta especie no produce hifas¹⁹⁴.

Los clamidoconidios son estructuras esféricas que producen las especies *C. albicans* y *C. dubliniensis*; en el caso específico de la primera se observan clamidoconidios terminales o intercalares que miden entre 6 y 12 µm de diámetro, con una membrana gruesa bien formada; mientras que *C. dubliniensis* forma clamidoconidios múltiples o en racimos^{95, 126}.

I.2.5.1.4.2 Identificación por los criterios bioquímicos

La identificación por pruebas bioquímicas se basa en el metabolismo de la levadura, ya sea mediante la detección de actividad enzimática debido a la hidrólisis de un sustrato cromogénico (medios cromogénicos) o la fermentación (zimogramas) y utilización (auxonogramas) de distintos carbohidratos y otros sustratos¹⁰⁸.

I.2.5.1.4.2.1 Medios cromogénicos

Los medios cromogénicos pueden ser utilizados para la obtención de los aislamientos primarios o con fines de identificación presuntiva; sin embargo, aún son limitados, ya que solo permite la identificación certera de algunas especies de *Candida* (Cuadro 6)⁷⁷.

I.2.5.1.4.2.2 Zimogramas

Los zimogramas evidencian la actividad metabólica del microorganismo mediante la fermentación – degradación anaerobia de distintos carbohidratos, esta prueba se realiza en medios de cultivo líquidos con una proporción de carbohidratos que fluctúa entre 1 y 5 %, además se le agrega un indicador de pH y una campana de fermentación (Durham), para detectar la producción de gas. Los medios se inoculan con las colonias crecidas de 24 horas y se incuban a 25 °C entre 24 y 48 horas; la lectura se realiza mediante el viraje del indicador, así como por la formación de gas^{22, 109}.

I.2.5.1.4.2.3 Auxonogramas

Los auxonogramas evidencian la actividad metabólica del microorganismo y proporcionan un perfil bioquímico basado en la utilización de distintos sustratos¹⁰⁹.

Diversos métodos comerciales de auxonogramas han sido desarrollados, los cuales varían en tiempo de ensayo, especificidad, sensibilidad y costos:

1. API 20 C AUX®. El sistema API 20 C AUX® (bioMérieux) se compone de 20 pozos con sustratos deshidratados que permite realizar 19 pruebas de asimilación de distintos carbohidratos. Las cúpulas se inoculan con medio mínimo previamente inoculado con la cepa a identificar, el microorganismo se reproduce únicamente si tiene la capacidad de utilizar el sustrato correspondiente de cada pozo, después de la inoculación se incuba a 30 °C entre 48 a 72 horas, dependiendo de la velocidad de crecimiento. La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático. Este sistema permite identificar un total de 34 especies de levaduras de *Candida* y de otros géneros^{26, 178}.

2. API ID 32C®. El sistema API ID 32C® (bioMérieux) es una versión ampliada del API 20C AUX®, éste se compone de 32 cúpulas: 29 contienen distintos hidratos de carbono deshidratados, una es control negativo, otra detecta sensibilidad a la cicloheximida y una más es una prueba colorimétrica para la esculina; a su vez, esta galería permite la identificación de 63 especies distintas y puede ser automatizada mediante el sistema ATB Expression® o mini API®^{71, 178}.

3. Vitek® 2. El sistema Vitek® 2 (bioMérieux) es un sistema totalmente automático para la detección del metabolismo fúngico que puede identificar levaduras y organismos a fines a partir de las primeras 15 horas de incubación, además tiene la capacidad de establecer el patrón de sensibilidad a distintos antifúngicos. Está basado en tarjetas con 47 pruebas bioquímicas fluorescentes, las cuales incluyen asimilación de carbohidratos y ácidos orgánicos, detección de oxidasas y arilamidasa. Este sistema se compone de una consola satélite para recabar la información, un módulo incubador, un nódulo principal donde se procesa la información con un software de análisis y un sistema experto avanzado^{11, 145}.

El sistema Vitek® 2 permite la identificación de 51 especies diferentes; sin embargo, en caso de baja discriminación requiere de pruebas adicionales, fundamentalmente morfológicas⁸⁷.

4. Rapid Yeast Identification Panel MicroScan®. El Rapid Yeast Identification Panel MicroScan® (Dade Behring) es un método automatizado para la identificación rápida de 40 especies de levaduras y microorganismo afines. Se basa en la utilización de pruebas convencionales y cromogénicas que evalúan las actividades enzimáticas del microorganismo; se utiliza una placa de microdilución de 96 pocillos que utiliza 27 sustratos deshidratados, la cual se incuba durante cuatro horas; la identificación se basa en la generación de perfiles numérico de acuerdo con las reacciones bioquímicas y su comparación con una base de datos numéricos²⁰⁶.

1.2.5.1.4.3 Identificación por los criterios inmunológicos

La identificación mediante criterios inmunológicos se basa en la reacción antígeno anticuerpo; generalmente se adiciona un anticuerpo específico para alguna proteína presente en la levadura a identificar; sin embargo, se carece de

anticuerpos y antígenos para muchos microorganismos y en algunos casos la detección no es precisa por existencia de cruces inmunológicos con otros microorganismos, ocasionando así falsos positivos¹⁴⁷.

Algunos métodos han sido estandarizados para la identificación específica de ciertas especies de *Candida*, como los siguientes:

1. Bichro-latex albicans®. Bichro-latex albicans® (Fumouze) es un método para la identificación rápida de *C. albicans* por aglutinación de partículas látex utilizando un anticuerpo monoclonal específico de esta especie¹⁷⁷.

La prueba se realiza con reactivos distintos: a) perlas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con el antígeno de *C. albicans* localizado en su pared celular, y b) un agente disociativo que permite la exposición del antígeno¹⁸⁹.

2. Krusei-color®. Krusei-color® (Fumouze) es otro de los métodos comerciales basados en criterios inmunológicos para la identificación de *C. krusei* por aglutinación de partículas de látex, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con un antígeno localizado en la pared de este microorganismo, dando como resultado aglutinación de color rojo⁷⁰.

I.2.5.1.4.4 Identificación por los criterios genéticos

Algunas especies de *Candida* son tan cercanas taxonómicamente que los perfiles bioquímicos y su morfología es muy similar, por lo que su identificación resulta complicada y con frecuencia se confunden entre ellas; tal es el caso de las especies *C. guilliermondii* y *C. famata*^{139, 140}.

Numerosos estudios han puesto en evidencia la poca utilidad de distintas metodologías comerciales (ID32C® y Vitek® 2)^{55, 96}, para la diferencia entre *C. guilliermondii* y *C. famata*, incluso entre *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*³⁵.

Debido a lo anterior, se han desarrollado otras metodologías más específicas para la identificación de levaduras del género *Candida*, cuya base está fundamentada en la variación genética y es aplicada mediante técnicas de biología molecular¹¹¹:

1. Reacción en cadena de la polimerasa – Fragmentos de restricción de longitud polimórfica. (PCR – RFLP). Esta técnica consiste en amplificar mediante PCR una secuencia genética específica de la levadura a identificar y posteriormente digerir dicha secuencia de ADN amplificado con enzimas de restricción, para determinar diferencias entre los patrones de bandas amplificadas y/o entre los patrones de los fragmentos resultantes de la digestión del ADN; algunas especies tienen patrones de corte específicos con ciertas enzimas de restricción, por lo que la identificación mediante esta técnica es más específica^{148, 197}.

Entre los segmentos más comúnmente usados para esta técnica se encuentran los genes ribosomales (18S), los espacios entre el conjunto de genes ribosomales (espacios intergenéticos IGS) y los espacios intertranscripcionales (ITS) del conjunto de genes ribosomales²¹⁶.

2. Secuenciación. Esta técnica se basa en la determinación del orden o secuencia de los nucleótidos que componen un fragmento específico de ADN a través de métodos enzimáticos y químicos; se ha propuesto el uso de los genes ribosomales, así como los ITS, para posteriormente compararlo con las secuencias existentes en los distintos bancos de genes y así identificar al microorganismo¹⁴³. La secuenciación es una metodología eficiente y altamente específica; sin embargo, es costosa por lo que su uso en el ambiente clínico dista de ser una realidad⁶⁴.

1.2.5.1.4.5 Espectrometría de masas

En los últimos años se han desarrollado otras metodologías para la identificación de las distintas especies de *Candida*; tal es el caso del *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight* (MALDI-TOF); esta técnica consiste en una ionización suave del microorganismo que provoca la vaporización intacta de moléculas termolábiles, no volátiles tales como proteínas y lípidos en un rango de peso molecular de entre 2 a 20 kDa^{46, 121}.

Esta tecnología permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a partir de colonias; este análisis conduce a la creación de un espectro de masas que es específico para cada especie⁷; debido a lo que esta tecnología se ha convertido en un recurso de

referencia para la identificación de microorganismos en los servicios de microbiología clínica²²⁹.

I.2.5.1.5 Epidemiología

La candidosis hematógena o candidemia es la forma de candidosis sistémica que se diagnostica con mayor frecuencia⁵². En EUA las especies de *Candida* son responsables del 8 al 10 % de las infecciones del torrente sanguíneo y son el cuarto patógeno más común que afecta esta localización. Asimismo, en Europa, *Candida* es el agente causal del 2 al 3 % de las infecciones sanguíneas y es el sexto y décimo patógeno más frecuente¹²⁴.

En el ambiente hospitalario, aproximadamente del 30 al 35 % de todos los episodios de candidemia se presentan en pacientes internados en la UCI¹¹⁹; además esta infección se asocia con una tasa de mortalidad del 40 al 60 %^{14, 42, 105, 113}.

En la Figura 8 se presenta las especies de *Candida* como agentes etiológicos más comunes de la candidemia. Las principales son: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*¹⁵³. *Candida albicans* ha sido catalogada como la especie predominante de la candidemia (65 – 70 %); sin embargo, la epidemiología ha cambiado en las dos últimas décadas, con incremento de las especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* como responsables de aproximadamente la mitad de los casos en algunas regiones geográficas^{14, 99, 132}. Ejemplo de ello es *C. parapsilosis* que tiende a ser más frecuente en el sur de Europa, Australia y América Latina^{14, 86, 176}.

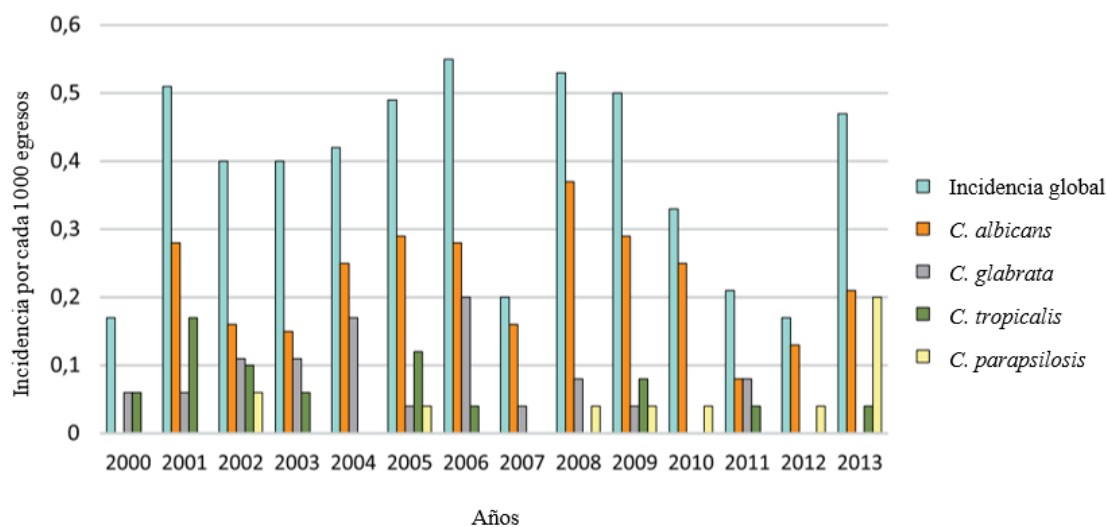


Figura 8. Incidencia anual de episodios de candidemia global y según especie desde el 2000 al 2013. Tomada de Siri, 2017²⁰¹.

La incidencia de infección sanguínea asociada a *C. guilliermondii* es del 1 al 4% dependiendo de la región geográfica, con un predominio en países de Latinoamérica¹⁶⁴. Otros autores han descrito brotes epidémicos de candidemias atribuidos a *C. guilliermondii*^{1, 221}.

I.2.5.1.5.1 Epidemiología en México

En México, al igual que en todo el mundo, la frecuencia en los casos de candidemia han tenido un notable incremento en las últimas dos décadas²¹⁷.

En nuestro país las cifras sobre la frecuencia de candidemia en pacientes de todas las edades no son claras, debido a que la candidemia no es una enfermedad de notificación obligatoria. Sin embargo, diversas publicaciones han reportado casos de candidosis invasiva, dentro de las cuales encontramos la candidemia; además, en la mayoría de los casos la candidosis en otros órganos es causada por la diseminación de *Candida* a partir de una infección primaria del torrente sanguíneo^{5, 184}.

Reyes & cols. en 2017 realizaron un estudio multicéntrico sobre el estatus actual de los agentes etiológicos causantes de candidosis invasiva en México en el periodo de 2005 a 2015, incluyeron los reportes de los estados de Nuevo León, Tamaulipas,

Coahuila, Sonora, Sinaloa, Durango, Jalisco, Michoacán, Estado de México y Ciudad de México. En este estudio se encontró que las cuatro especies más comunes asociadas con la candidosis invasiva fueron: *C. albicans* (40.2 %), complejo *C. parapsilosis* (18.66%), *C. tropicalis* (17.22 %) y complejo *C. glabrata* (14.04%) (Figura 9)¹⁸⁴.

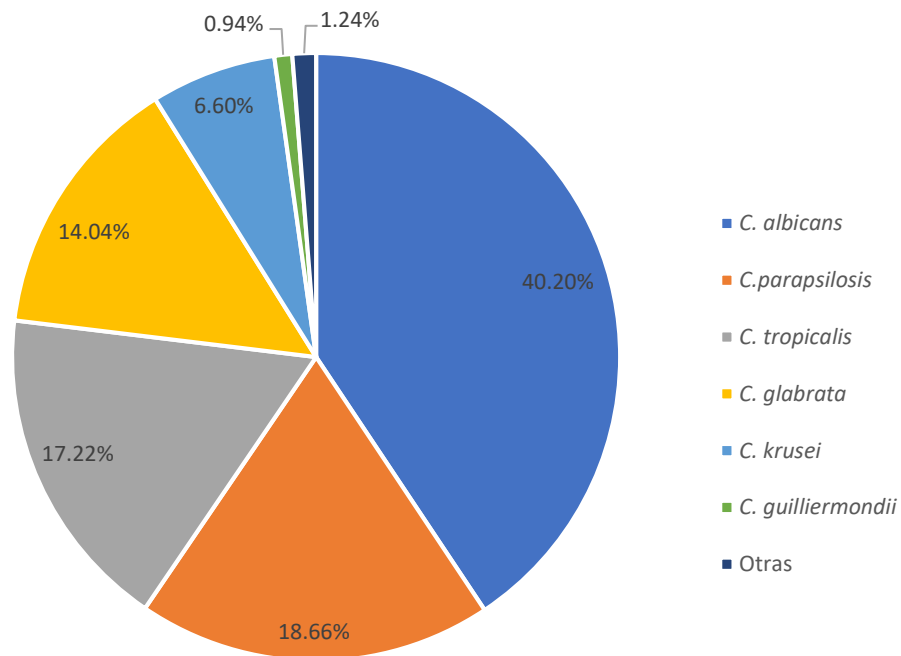


Figura 9. Frecuencia de las especies de *Candida* spp. como agentes etiológicos de la candidosis invasiva en México, en el periodo de 2005 – 2015 de acuerdo con Reyes & cols. 2015¹⁸⁴.

De los estudios de candidemia en la población pediátrica mexicana está el realizado por Santolaya & cols. en 2014, en el cual se estudiaron 302 casos de candidemia provenientes de 23 hospitales de tercer nivel en diferentes estados de la República Mexicana; este estudio demostró que las tres especies de mayor frecuencia fueron: *C. albicans* (38.98 %), *C. parapsilosis* (27.13 %) y *C. tropicalis* (14.87 %) (Figura 10)¹⁹².

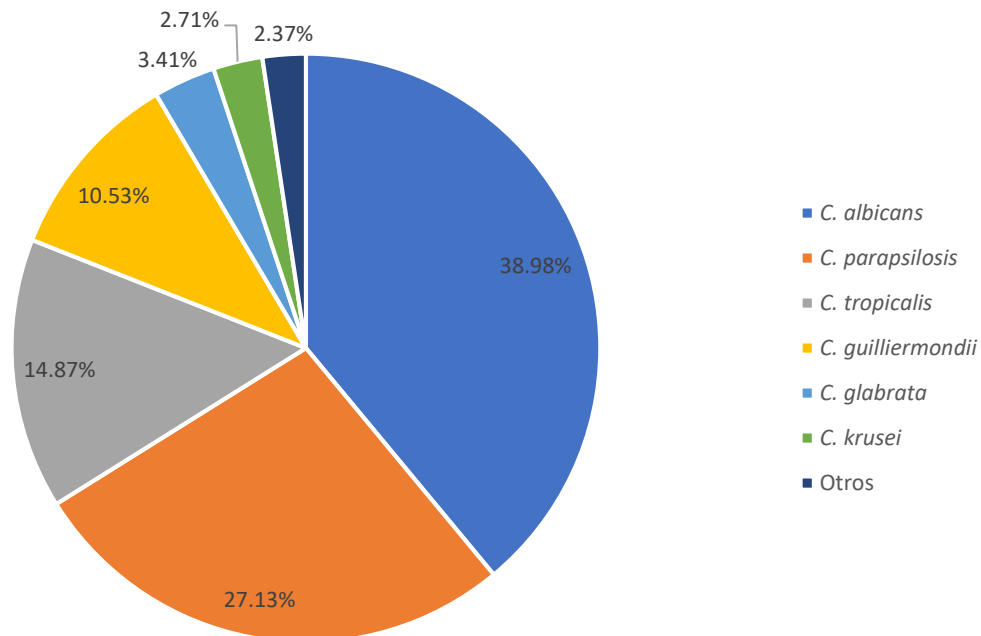


Figura 10. Distribución de agentes etiológicos de candidosis hematogena en pacientes pediátricos en México, durante 2005 de acuerdo con Santolaya & cols. 2014¹⁹².

Otros estudios han demostrado que *C. guilliermondii* está entre las seis especies principales causantes de candidemia en pacientes pediátricos^{52, 219}.

I.2.5.1.6 Tratamiento

Las herramientas actuales de diagnóstico de laboratorio son insuficientes o requieren un tiempo prolongado de procesamiento para corroborar un diagnóstico clínico de infección sanguínea por *Candida* spp., además de que se asocia una alta mortalidad con el retraso en el inicio del tratamiento antifúngico, por lo que es común el inicio de terapia empírica en pacientes con candidosis hematogena^{12, 163}.

Después de confirmar el diagnóstico de candidosis hematogena, e iniciar el tratamiento antifúngico, se deben realizar los exámenes necesarios para la evaluación del paciente; además se recomienda la repetición de los hemocultivos al día tres y cinco, o hasta que los hemocultivos no muestren crecimiento¹⁵².

I.2.5.1.6.1 Terapia empírica

La terapia empírica, generalmente es utilizada en pacientes de alto riesgo y en pacientes con signos y síntomas altamente sugestivos de candidemia como fiebre persistente a pesar de terapia antibiótica apropiada, leucocitosis e hipotensión. Los pacientes neutropénicos con sospecha de candidemia se les administra fluconazol, a una dosis inicial de 800 mg (12 mg/kg), posteriormente 400 mg diarios (6 mg/kg); sin embargo, si la epidemiología local sugiere una alta probabilidad de especies diferentes a *C. albicans* se prefiere el uso de voriconazol, dosis inicial de 6 mg/kg dos veces al día y posteriormente 3 mg/kg dos veces al día^{83, 141}.

El esquema alternativo incluye la administración de equinocandinas como la caspofungina cuya dosis de carga es de 70 mg y posteriormente 50 mg diarios, o la micafungina con dosis diaria de 100 mg. Incluso, se recomienda anfotericina B liposomal (3 mg/kg diarios) o anfotericina B complejo lipídico (5 mg/kg diarios)¹⁴¹.

I.2.5.1.6.2 Terapia para candidemia confirmada

Es importante considerar el estado del paciente para el inicio de tratamiento antifúngico en la candidemia confirmada; en el caso de pacientes adultos no neutropénicos, las equinocandinas son la primera línea de elección, debido a la actividad fungicida contra todas las especies de *Candida*⁴¹. La administración de este fármaco es ideal por los cambios que se han presentado en el perfil de la sensibilidad a los antifúngicos, el incremento en la prevalencia de *C. glabrata* y su resistencia a fluconazol; asimismo la progresiva disminución de la sensibilidad de *C. krusei* frente a los azoles^{68, 155}. Además, en la candidemia se ha encontrado que algunas especies de *Candida* tienen la capacidad de desarrollar resistencia después de la exposición al medicamento; entre ellas se han descrito a *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* y *C. mutants*^{24, 205}.

En México el antifúngico más utilizado para el tratamiento primario de los pacientes con candidemia es el fluconazol; sin embargo, en la literatura se ha reportado el incremento de la mortalidad de los pacientes tratados con este fármaco, por lo tanto, la administración de equinocandinas es considerada la primera elección¹⁴¹.

Las alternativas al uso de una equinocandina en pacientes con neutropenia incluyen la formulación lipídica de anfotericina B, voriconazol o fluconazol¹⁵³.

En pacientes pediátricos con o sin inmunosupresión el tratamiento de primera elección es la anfotericina B (0.5 – 1 mg/kg/día vía intravenosa) con una dosis máxima de 20 – 30 mg/kg; en el caso de alteración renal se recomiendan las fórmulas de complejos lipídicos de anfotericina B (5 mg/kg/día)⁹⁸.

I.3 Estructura y mecanismo de acción de los antifúngicos

Un antifúngico es cualquier sustancia capaz de producir una alteración en la estructura de una célula fúngica e inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia. Los antifúngicos se pueden clasificar de acuerdo con su estructura química en azoles, polienos, equinocandinas y pirimidinas; de igual forma se pueden clasificar por su mecanismo de acción en: inhibidores de la síntesis de ergosterol; desestabilizadores de la membrana fúngica; inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos y en inhibidores de la síntesis de pared fúngica⁸⁵.

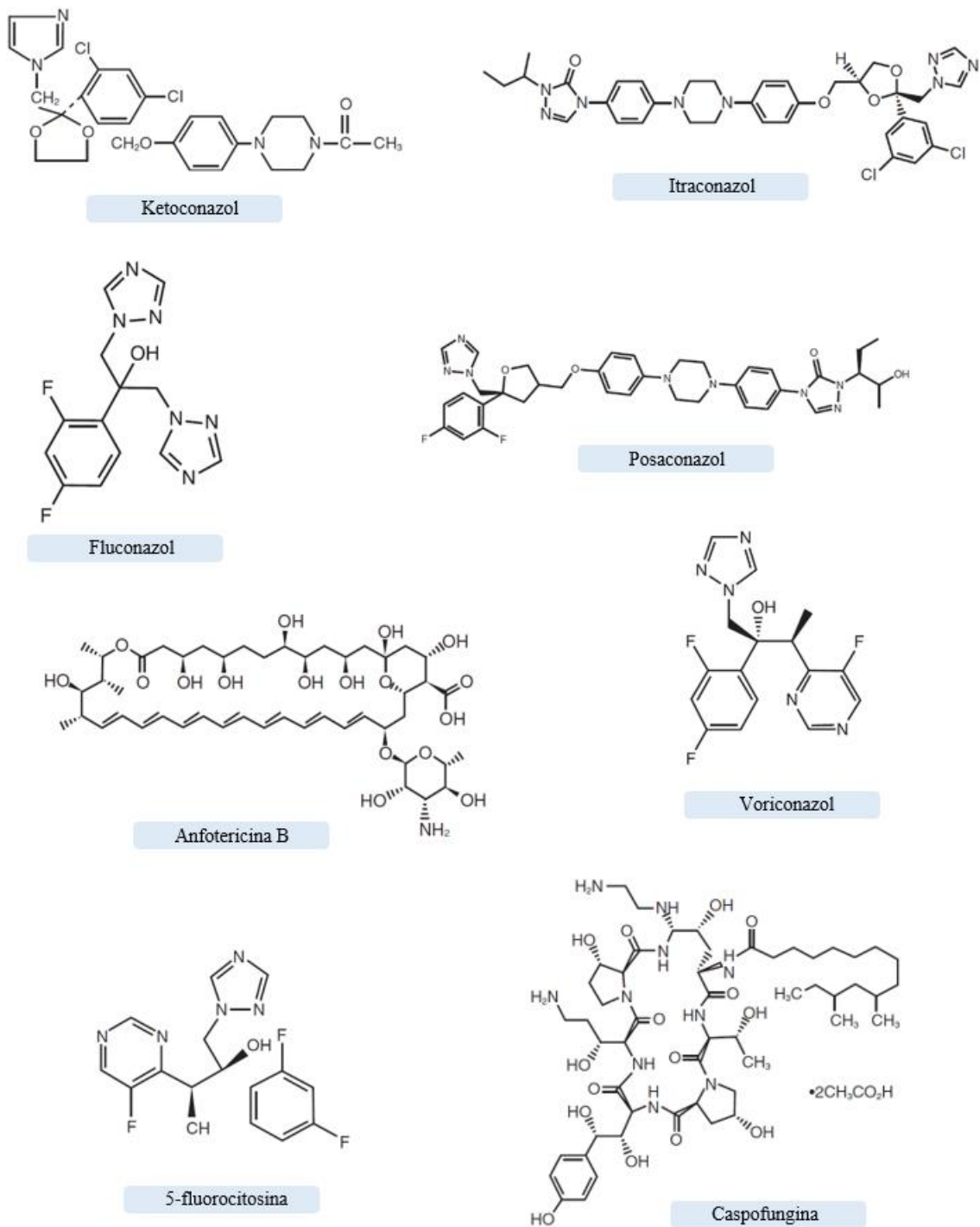


Figura 11. Estructuras químicas de diversos antifúngicos. Tomada y modificada de Bonifaz, 2012²².

I.3.1 Inhibidores de la síntesis de ergosterol

Dentro de este grupo de fármacos están los imidazoles (ketoconazol) y los triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol), los cuales poseen heterocícllos aromáticos de estructura similar al 1,3-ciclopentadieno, con algunos átomos de carbono sustituidos por átomos de nitrógeno (Figura 11). Ambos ejercen su efecto fungistático mediante la inhibición de la 14 α -desmetilasa dependiente del citocromo P-450-oxidasa. Al alterar esta ruta metabólica se genera un aumento de lanosterol y disminución de ergosterol, lo cual ocasiona la síntesis de una membrana celular defectuosa que altera el intercambio celular (Figura 12)^{80, 81, 191, 215}.

I.3.2 Desestabilizadores de membrana fúngica

Los fármacos incluidos en este grupo son los derivados poliénicos, antifúngicos naturales obtenidos de distintas especies de *Streptomyces*. Su estructura básica es de un macrólido poliénico, formado por un anillo de 26-38 carbonos; puede tener como radicales un éster o una lactona interna. Entre los más importantes se encuentran la anfotericina B, la nistatina y la pimaricina (Figura 11)^{75, 76}.

Los derivados poliénicos actúan uniéndose al ergosterol de la membrana fúngica a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Vander Waals, lo que origina la formación de grandes poros y espacios en la membrana celular, resultando en la filtración de iones intracelulares y la entrada de iones extracelulares de las células fúngicas, lo cual conduce a la despolarización de la membrana y una mayor permeabilidad de protones y cationes monovalentes^{24, 91, 196}. También interfieren con la función enzimática oxidativa asociada a la membrana²⁴.

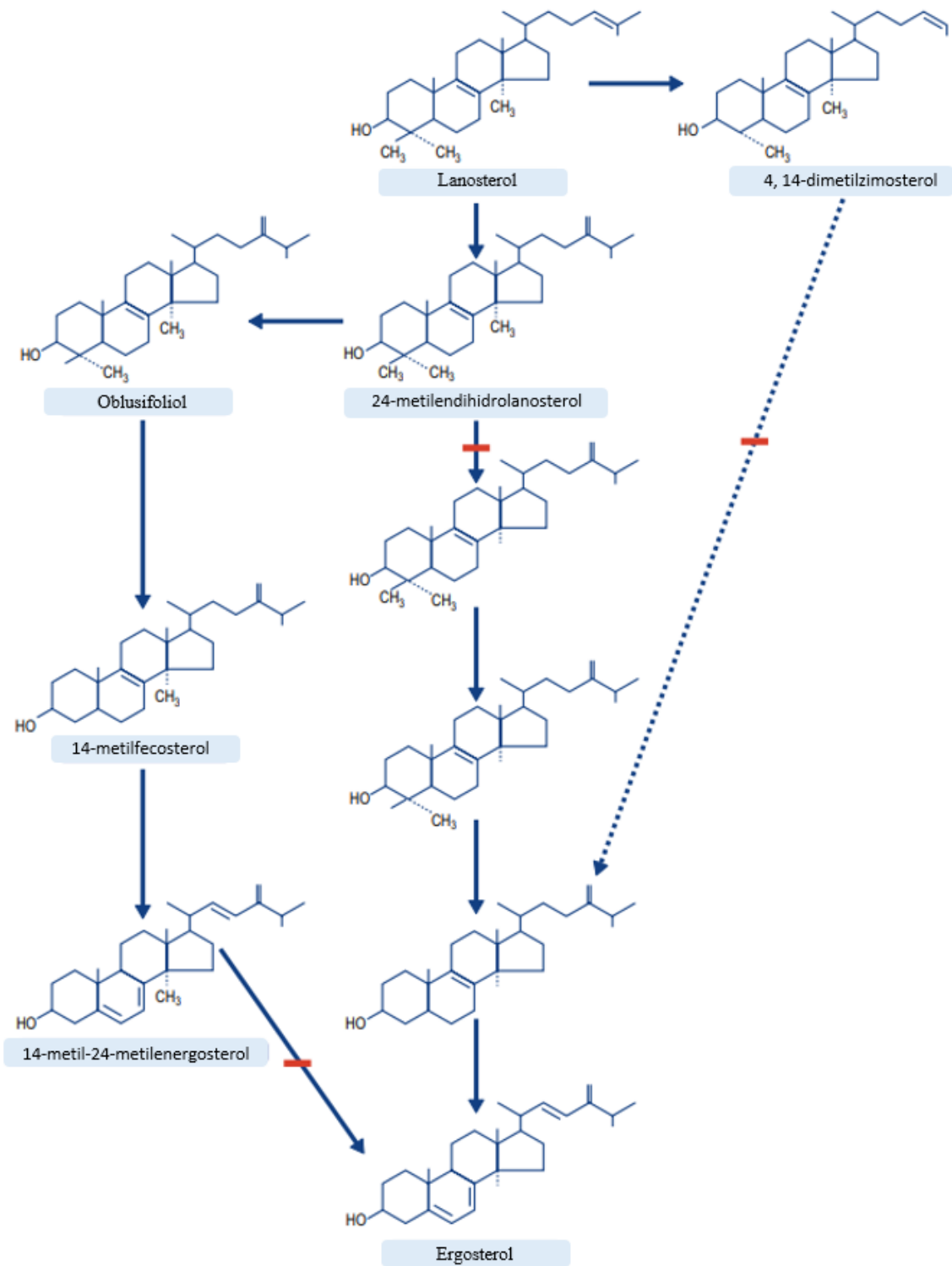


Figura 12. Puntos de bloqueo por acción de los triazoles e imidazoles en la síntesis del ergosterol. Tomada y modificada de Annaissie, 2009⁵.

I.3.3 Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

Dentro de los inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos encontramos a la 5-fluorocitosina (flucitosina), que es una pirimidina fluorada de origen sintético (Figura 11); para ejercer su efecto, la flucitosina se transporta dentro de la célula fúngica mediante la enzima de transporte citosina permeasa¹⁷², una vez dentro de la célula fúngica la flucitosina experimenta rápidamente una conversión intracelular a 5-fluorouracilo a través de la citosina desaminasa; los hongos que carecen de esta enzima son intrínsecamente resistentes a este fármaco¹⁷³.

Después de la conversión intracelular a 5-fluorouracilo, el efecto antifúngico se ejerce a través de uno de dos mecanismos independientes. El primer mecanismo se basa en una serie de reacciones de fosforilación, el 5-fluorouracilo se convierte de manera seriada en 5-fluorouridina trifosfato, éste se incorpora en el ARN fúngico en lugar de ácido uridílico lo cual altera la aminoacilación del ARN de transferencia y finalmente inhibe la síntesis de proteínas²²².

El segundo mecanismo es por la inhibición de la síntesis de ADN, este mecanismo secundario implica el metabolismo de 5-fluorouracilo en 5-fluorodesixiuridina monofosfato por la monofosfato pirofosforilasa de uridina; la 5-fluorodesixiuridina es un potente inhibidor de la timidilato sintetasa, la cual es una enzima fundamental para la biosíntesis del ADN⁵⁶.

El espectro antifúngico de la flucitosina es limitado a infecciones causadas por levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus neoformans*¹⁷⁴. El desarrollo de resistencia a la flucitosina puede ocurrir en varios de los pasos de su mecanismo de acción incluido el transporte a la célula y la desaminación para la formación del compuesto activo¹⁸³.

I.3.4 Inhibidores de la síntesis de pared fúngica

Los inhibidores de la síntesis de pared fúngica son antimicóticos de origen natural obtenidos de diversos hongos (*Glarea lozoyensis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus rugulosus*); existen dos familias con esta actividad, las equinocandinas y las nikkomicinas, las cuales interfieren en la síntesis de glucanas y quitina respectivamente^{22, 187}.

Las equinocandinas son péptidos cíclicos con una cadena lateral de ácido graso¹⁸⁷, de los cuales el más utilizado es la caspofungina (Figura 11). Este antifúngico es un derivado semisintético de pneumocandina Bo⁵⁴. El mecanismo de acción se basa en la alteración de la síntesis de la pared celular mediante la inhibición de la enzima β 1,3-D-glucano sintetasa, lo que bloquea la síntesis de β 1,3-D-glucano que es uno de los principales componentes de la pared celular de los hongos patógenos. El resultado final es la lisis osmótica de la célula fúngica⁸⁸. La caspofungina posee un estrecho espectro antifúngico que está restringido a levaduras del género *Candida* y a algunas especies de *Aspergillus*⁵.

I.4 Evaluación del patrón de sensibilidad

Las pruebas de sensibilidad son fundamentales para comparar la actividad del fármaco y detectar posible resistencia para indicar oportunamente la mejor opción terapéutica³⁰.

Las pruebas de sensibilidad antifúngica fueron evaluadas por dos instituciones internacionales dedicadas a la estandarización de estas técnicas sobre diversos hongos (levaduriformes y filamentosos). Las instituciones son el Instituto de Estandarización de Laboratorios Clínicos (CLSI, por sus siglas en inglés) y el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST, por sus siglas en inglés)²²⁸.

I.4.1 Clasificación de las pruebas de sensibilidad

En general, las pruebas pueden clasificarse en: 1) métodos cualitativos que se restringen a evaluar únicamente si un microorganismo es sensible o resistente dependiendo de la técnica utilizada; 2) métodos semicuantitativos que proporcionan valores parciales de concentración mínima inhibitoria (CMI) y 3) métodos cuantitativos los cuales proporcionan datos numéricos de la CMI.

I.4.1.1 Métodos cualitativos y semicuantitativos.

I.4.1.1.1 Método de difusión en disco

El método de difusión en disco está basado en la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido. La actividad del fármaco se evidencia por la formación de un halo de inhibición; sin embargo, su uso ha sido limitado por los problemas de difusión que presentan los antifúngicos en el agar y por la falta de correlación clínica^{10, 41}.

Este método fue estandarizado por el CLSI, para llevarlo a cabo se deben seguir los lineamientos descritos en el documento M44-A (Cuadro 7); sin embargo, el documento únicamente establece puntos de corte para fluconazol y voriconazol⁴¹.

Cuadro 7. Características del método de difusión en disco para levaduras descritos en el documento M44-A por el CLSI⁴¹.

| Parámetros | Descripción (M44-A) |
|----------------------------------|---|
| Medio de cultivo | Agar Mueller Hinton + 2 % de glucosa |
| pH | 7,2 – 7,4 |
| Inóculo | 1×10^6 UFC/ml - 5×10^6 UFC/ml |
| Temperatura de incubación | 35 °C |
| Tiempo de incubación | 20 – 24 horas |
| Puntos de corte | Fluconazol: R \leq 14 m, S-DD 15 – 18 mm, S \geq 19 mm Voriconazol: R \leq 13 m, S-DD 14 – 16 mm, S \geq 17 mm |

| Parámetros | Descripción (M44-A) |
|--------------------|------------------------------------|
| Carga del disco | Fluconazol 25 µg |
| | Voriconazol 1µg |
| | Posaconazol 5 µg |
| Control de calidad | <i>C. parapsilosis</i> ATCC® 22019 |
| | <i>C. krusei</i> ATCC® 6258 |
| | <i>C. albicans</i> ATCC® 90028 |
| | <i>C. tropicalis</i> ATCC® 750 |

I.4.1.2 Métodos cuantitativos

I.4.1.2.1 Método de microdilución en caldo

Este método constituye el estándar de oro para la determinación del perfil de sensibilidad *in vitro*, en levaduras y en hongos filamentosos. Los métodos de microdilución consisten en preparar placas de microdilución de 96 pozos con la distribución de las distintas concentraciones de los antifúngicos y posteriormente son inoculadas con una concentración específica de microorganismos³⁰. En la actualidad se dispone de dos estándares: el método de microdilución en caldo para levaduras; basado en el documento M27 – A3 del CLSI, y en el documento 7.1 del EUCAST. Aunque ambos métodos son similares, presentan algunas variaciones en la metodología (Cuadro 8); sin embargo, han mostrado una reproducibilidad elevada y buena correlación intra e interlaboratorio^{40, 47}.

Cuadro 8. Parámetros necesarios para la realización de las pruebas de sensibilidad en levaduras por microdilución en caldo, del CLSI (M27 – A3) y EUCAST (7.1)^{41, 65}.

| Parámetros | Metodología (CLSI) M27 – A3 | Metodología (EUCAST) 7.1 |
|--|--|---|
| Medio de cultivo | RPMI 1640 + 0,2 % glucosa | RPMI 1640 + 2,0 % glucosa |
| Solución amortiguadora | Ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0.165 M | Ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0.165 M |
| pH | 7 ± 0,1 | 7 ± 0,1 |
| Concentración del inóculo de la levadura problema | 1 × 10 ⁶ UFC/ml - 5 × 10 ⁶ UFC/ml | 1 × 10 ⁵ UFC/ml - 5 × 10 ⁵ UFC/ml |
| Temperatura de incubación | 35 °C | 35 °C – 37 °C |
| | <i>Candida spp</i> | |
| | Equinocandinas (24 horas) | |
| Tiempo de incubación | Anfotericina B, fluconazol (24 – 48 horas) | 24 horas |
| | 5-fluorocitosina, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol, ketoconazol (48 horas) | |

| Parámetros | Metodología (CLSI) M27 – A3 | Metodología (EUCAST) 7.1 |
|-------------------------------------|---|---|
| Concentraciones antifúngicas | Fluconazol y 5-fluorocitocina: 0,06 – 64 µg/ml | Anfotericina B: 0,03 – 16 µg/ml |
| | Anfotericina B, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol, ketoconazol y equinocandinas: 0.03 – 16 µg/ml | Fluconazol y 5-fluorocitocina: 0,125 – 64 µg/ml Itraconazol, ketoconazol y voriconazol: 0,015 – 8 µg/ml |
| Lectura | Visual | Espectrofotométrica (530 nm) |
| Lectura de CMI | 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol, ketoconazol, equinocandinas: 50 % de reducción en la turbidez en comparación con el control de crecimiento. | 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol, ketoconazol, equinocandinas: 50 % de reducción en la turbidez en comparación con el control de crecimiento. |
| | Anfotericina B: Ausencia de turbidez visible | Anfotericina B: ≤ 90 % reducción en turbidez en comparación con el control de crecimiento. |
| Control de calidad | <i>C. parapsilosis</i> ATCC® 22019 <i>C. krusei</i> ATCC® 6258 | <i>C. parapsilosis</i> ATCC® 22019 <i>C. krusei</i> ATCC® 6258 |

I.4.1.2.2 Métodos de macrodilución en caldo

El método de macrodilución fue la primera opción descrita de métodos en caldo por el CLSI, la diferencia radica en el empleo de tubos estériles de 11 × 70 mm; sin

embargo, el método de macrodilución se utiliza poco, y es útil cuando no se dispone de medios comerciales o placas de microdilución³⁰.

I.4.1.3 Métodos comerciales

Los diferentes métodos comerciales fueron elaborados y estandarizados, útiles y eficientes para la aplicación en laboratorios clínicos y así evaluar el perfil de sensibilidad en un menor tiempo.

1. Etest® (AB BioDisk). Este sistema es un método simple que consiste en la inoculación del hongo en la superficie de placas de agar RMPI 1640, seguido de la aplicación de una tira plástica impregnada con un gradiente de concentración del antifúngico, posteriormente la placa de agar se incuba a 37 °C durante 24 a 48 horas. La lectura de la CMI se realiza en el punto de intersección del halo elipsoidal de inhibición con la graduación de la tira. Este método se ha utilizado en hongos levaduriformes como filamentosos y mide la actividad antifúngica de anfotericina B, fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina, voriconazol, posaconazol y caspofungina^{127, 228}.

2. ATB Fungus 3®. El método empleado por el sistema comercial ATB Fungus 3® (bioMérieux) permite la determinación del perfil de sensibilidad mediante la inoculación del microorganismo en un medio semisólido; la lectura se hace de manera visual y permite clasificar los aislados como sensibles, intermedios o resistentes por el valor de CMI, con este método se mide la actividad de 5-fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol y voriconazol²³⁰.

3. ASTY colorimetric panel®. El sistema ASTY colorimetric panel® tiene la capacidad de determinar el perfil de sensibilidad mediante el uso de tiras con pozos que contienen previamente deshidratadas las concentraciones de antifúngicos (anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol) el procedimiento a seguir es parecido al establecido por el CLSI en el documento M27-A3; sin embargo, este sistema tiene un indicador de pH el cual vira de acuerdo al resultado obtenido, el viraje de color azul a púrpura indica inhibición de crecimiento y el viraje a rojo cuando hay desarrollo fúngico^{34, 160}.

4. Fungitest®. El sistema Fungitest® (BioRad) consiste en una galería con pozos que incorporan concentraciones discriminantes para conocer la sensibilidad a seis antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, 5-fluorocitosina y miconazol); sin embargo, este sistema solamente da resultados cualitativos, es decir, si el microorganismo es sensible, intermedio o resistente^{34, 51, 209}.

5. Sensititre YeastOne®. El sistema Sensititre YeastOne® fue diseñado por Thermo Scientific™ en la década de los 90s, este sistema se basa en una técnica de microdilución en medio líquido RPMI 1640 con glucosa que contiene un indicador oxido-reducción (azulAlamar®), la adición del indicador facilita la medición de la actividad metabólica; el cambio de color que provoca se basa en la conversión de resazurina (tinte azul) que es convertida por enzimas mitocondriales y algunas otras a resorufin (rosa fluorescente)^{144, 179}.

Mediante este método se puede determinar la sensibilidad *in vitro* de forma cuantitativa y por medio de un cambio colorimétrico a ocho antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, 5-fluorocitosina, posaconazol, voriconazol y caspofungina); es uno de los métodos más utilizados en laboratorios clínico por la buena correlación que tiene con el estándar de oro (M27 – A3)^{17, 34, 161}.

En la literatura mundial se han descrito varios estudios comparativos de la actividad de los diversos antifúngicos sobre *Candida* spp. con los distintos métodos. Los valores de concordancia entre los distintos métodos y el método SENSITITRE YeastOne® están en el rango del 70 al 99 %, valores que ha demostrado buena correlación con el método de referencia (Cuadro 9)^{3, 63, 67, 167}.

Cuadro 9. Estudios comparativos de sensibilidad antifúngica entre el método SENSITITRE YeastOne® y otros métodos.

| Antifúngico | Método comparativo | Concordancia (%) | Autor |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|----------------------|
| Caspofungina | M27 – A2 (CLSI) | 96 % | Espinel, 2004 |
| Posaconazol | | 96 % | |
| Voriconazol | | 95 % | |
| Ravuconazol | | 98 % | |
| Fluconazol | | 99 % | |
| Anfotericina B | | 98 % | |
| Voriconazol | Documento 7.1 (EUCAST) | 95.5 % | Cuenca, 2010 |
| Fluconazol | | 97.2 % | |
| 5 – Fluorocitosina | | 96 % | |
| Anfotericina B | | 97.9 % | |
| Itraconazol | ATB® FUNGUS 2 | 95 % | Torres, 2007 |
| Fluconazol | | 88 % | |
| 5 – Fluorocitosina | | 99 % | |
| Anfotericina B | | 97 % | |
| Fluconazol | Vitek® 2 | 78.4 % | Vijgen, 2011 |
| Voriconazol | | 84.6 % | |
| Anfotericina B | | 90.8 % | |
| Fluconazol | M27 – A3 (CLSI) | 87.3 % | Bertout, 2010 |
| Itraconazol | | 79.4 % | |
| Voriconazol | | 86.3 % | |
| 5 – Fluorocitosina | | 94.1 % | |
| Anfotericina B | | 72.6 % | |
| Caspofungina | | 97.1 % | |

II. Planteamiento del problema

La incidencia de fungemias causadas por diversas especies de *Candida* ha tenido un incremento en los últimos años debido al mayor número de pacientes que presentan enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, leucemias, linfoma, VIH-SIDA o diversos tratamientos con fármacos inmunosupresores y trasplante de órganos.

Candida albicans es la especie de mayor frecuencia causante de candidemias, en diferentes instituciones de salud conserva el primer lugar como agente etiológico; sin embargo, en los últimos años ha disminuido su porcentaje de aislamiento y ha sido sustituido por otras especies. La mayoría de estas especies comparten el desarrollo de resistencia a los diferentes antifúngicos, característica importante que les ha favorecido en el éxito como patógenos en el humano. Algunas de estas especies poseen resistencia intrínseca, como es el caso de *C. krusei*, pero otras adquieren esta capacidad y por tanto representan un problema clínico de relevancia ya que prolonga la estancia hospitalaria de los pacientes.

Los pacientes con candidosis hematógena pueden prolongar su estancia hospitalaria hasta los 30 días, debido a la administración de tratamientos inadecuados, hecho que podría repercutir en el aumento de los índices de mortalidad, estancia hospitalaria prolongada del paciente y en la economía del sistema de salud.

La identificación de la especie causante de candidemia y el perfil de sensibilidad, son variables que van a representar gran relevancia al momento de instituir un tratamiento, ya que se podría detectar de manera oportuna la resistencia a los antifúngicos. La identificación de diversas especies es complicada por los métodos tradicionales y comerciales, debido a las características fenotípicas similares e indistinguibles entre algunas especies, tal es el caso de *C. guilliermondii* con *C. famata*, las cuales se identifican incorrectamente por metodologías fenotípicas hasta en el 90 % de los casos; incluso, aunque menos frecuente puede ser confundida con *C. parapsilosis*.

Por otro lado, la determinación del perfil de sensibilidad a los antifúngicos sobre los agentes causales de candidemia utilizando los métodos estandarizados suele ser tardado y laborioso; por lo que en los últimos años se han desarrollado diversas técnicas que facilitan la determinación de dicho perfil; sin embargo, en ocasiones la correlación de metodologías comerciales con los estándares de oro es desconocida, por lo que no se puede asegurar el perfil de sensibilidad antifúngica de cada una de las especies de *Candida*.

Diversos autores coinciden en el aumento en la frecuencia y en la pobre respuesta observada en el tratamiento en los pacientes con candidemia causada por *C. guilliermondii*, así como la evidencia *in vitro* de la baja actividad de los azoles y resistencia a caspofungina, aunque aún existe controversia de estos hallazgos sobre esta especie. Además, en México no existen estudios comparativos ni parámetros de CMI de los antifúngicos de uso común sobre *C. guilliermondii*.

Debido a lo anterior es importante llevar a cabo estudios comparativos entre los distintos métodos de sensibilidad antifúngica sobre *C. guilliermondii*, para así poder establecer datos confiables acerca del perfil de sensibilidad a los antifúngicos, con la finalidad de establecer parámetros epidemiológicos locales de la CMI de los distintos antifúngicos sobre esta especie, los cuales serán de utilidad al instaurar el tratamiento antifúngico en el paciente.

III. Hipótesis

El desarrollo de resistencia a los diferentes antifúngicos es uno de los principales factores responsables de la elevada tasa de mortalidad a causa de candidemia.

El método de referencia para determinar el perfil de sensibilidad a antifúngicos (M27 – A3) será intercambiable con el método comercial SENSITRE YeastOne®.

IV. Objetivos

IV.1 Objetivo general

Conocer el perfil de sensibilidad antifúngica en aislados de *Candida guilliermondii* obtenidos de cultivos de sangre de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría y comparar dos métodos de microdilución en caldo.

VI.2 Objetivos particulares

- Identificar por métodos fenotípicos y moleculares los aislados de *C. guilliermondii*.

- Determinar el perfil de sensibilidad de los aislados de *C. guilliermondii* por el método de microdilución en caldo del Instituto de Estandarización de Laboratorios Clínicos (M27 – A3).

- Valorar el perfil de sensibilidad de los aislados de *C. guilliermondii* por el método SENSITITRE YeastOne®.

- Comparar las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas por los dos métodos de microdilución en caldo para verificar su intercambiabilidad.

V. Metodología

V.1 Aislados

Estudio prospectivo, transversal y observacional realizado en 22 aislados clínicos de *Candida guilliermondii* obtenidos de hemocultivos de 12 pacientes pediátricos, los cuales fueron procesados en el Laboratorio de Parasitología y Micología del Instituto Nacional de Pediatría.

Los aislados clínicos fueron identificados por CHROMagar Candida® y por el sistema API®/ID32 (Cuadro 10). En la Unidad de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México se realizaron pruebas fenotípicas adicionales para su identificación: morfología en agar fécula de papa - zanahoria con tween 80 al 1 %, CHROMagar Candida® y crecimiento en agar dextrosa Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (ADS-CC); así como la identificación por técnicas de biología molecular. La cepa de referencia utilizada fue ATCC® 6260 *Meyerozyma guilliermondii* (*Candida guilliermondii*).

Cuadro 10. Identificación de los aislados procesados en el Laboratorio de Parasitología y Micología del Instituto Nacional de Pediatría.

| Número | Clave | Servicio | CHROMagar Candida® | Identificación API®/ID32 |
|--------|---------|------------------|--------------------|-------------------------------|
| 1 | 06183 | UCI ^a | Lila | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 2 | 06185 | UCI ^a | Lila | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 3 | 06205 | Infectología | Lila | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 4 | 06215 | Cirugía | Lila | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 5 | 06231 | UCI ^a | Lila | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 6 | 06234 | UCI ^a | Lila | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 7 | 06240 | Cardiología | Lila | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 8 | 06241 | Cardiología | Lila | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 9 | 07033 | Infectología | Lila | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 10 | 08111 | Cirugía | Lila | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 11 | 06 - 05 | UCI ^a | Morado | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 12 | 06 - 08 | UCI ^a | Morado | <i>Candida guilliermondii</i> |

| Número | Clave | Servicio | CHROMagar Candida® | Identificación API®/ID32 |
|--------|---------|-------------------|--------------------|-------------------------------|
| 13 | 06 - 07 | UCI ^a | Morado | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 14 | 06 - 10 | Cirugía | Morado | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 15 | 06 - 11 | Cirugía | Morado | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 16 | 06 - 12 | UCI ^a | Morado | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 17 | 06 - 13 | UCI ^a | Morado | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 18 | 07 - 01 | UCI ^a | Morado | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 19 | 07 - 06 | UCI ^a | Blanca | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 20 | 07 - 10 | Hematología | Blanca | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 21 | 06 - 15 | Gastroenterología | Morado | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 22 | 06 - 14 | UCI ^a | Morado | <i>Candida guilliermondii</i> |

^a Unidad de cuidados intensivos.

V.2 Identificación

V.2.1 Identificación fenotípica

V.2.1.1 Identificación mediante los criterios bioquímicos

Todos los aislados obtenidos fueron crecidos en agar dextrosa Sabouraud (ADS) a 30 °C durante 24 horas, e inoculados en CHROMagar Candida® por estría de aislamiento e incubados a 37 °C durante 48 horas para obtener cultivos monospóricos, así como para tener una identificación presuntiva de acuerdo con la coloración que las colonias de *Candida* spp., descritas por algunos autores (Cuadro 11). La coloración de las colonias fue comparada con el catálogo de Pantone® para la clasificación del color por código^{146, 150}.

Cuadro 11. Coloración de las diversas especies de *Candida* en CHROMagar Candida®^{5, 77}.

| Especies de <i>Candida</i> | Coloración |
|----------------------------|--------------------------------|
| <i>C. albicans</i> | Verde claro |
| <i>C. tropicalis</i> | Azul metálico |
| <i>C. glabrata</i> | Rosa – morada |
| <i>C. krusei</i> | Malva – rosa (apariencia seca) |
| <i>C. parapsilosis</i> | Blanca – rosa pálido |

| Especies de <i>Candida</i> | Coloración |
|-----------------------------------|--------------------------|
| <i>C. guilliermondii</i> | Lila (colonia brillante) |
| <i>C. famata</i> | Lila (colonia mate) |

V.2.1.2 Crecimiento en presencia de cicloheximida

Una vez verificada la pureza de los aislados, éstos se inocularon por estría de aislamiento en placas de ADS – CC. Todas las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas. Los aislados se clasificaron en sensibles o resistentes a la cicloheximida.

V.2.1.3 Formación de pseudohifas

Todos los aislados se sembraron en una caja de Petri con agar fécula de papa – zanahoria con tween 80 al 1.0 % empleando la técnica de Dalmau¹⁰⁸. Este ensayo se empleó para evidenciar la formación de pseudohifas.

1. Con un asa bacteriológica previamente esterilizada se tomó una pequeña porción del crecimiento colonial de 24 o 48 horas y se inocularon dos líneas paralelas en un área de aproximadamente 1 cm²; entre cada inoculación se esterilizó el asa bacteriológica.

2. Nuevamente con el asa bacteriológica estéril, se recorrió el área de inoculación en sentido opuesto con el fin de disminuir la cantidad de inóculo.

3. Finalmente se colocó un cubreobjetos previamente esterilizado sobre las líneas de inoculación.

4. Se incubaron a 28 °C durante 72 horas; posteriormente, se observaron al microscopio con los objetivos 10 X y 40 X.

V.2.2 Identificación molecular

De cada uno de los aislados de *Candida guilliermondii* y de *Candida parapsilosis* se realizó una siembra masiva en ADS y se incubó a 35 °C durante 24 horas; posteriormente, se recolectó la totalidad de la masa fúngica y se inoculó en una segunda placa de ADS, con incubación a 35 °C durante 24 horas.

V.2.2.1 Extracción de ADN

La masa fúngica cosechada fue macerada con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana, hasta obtener un polvo fino. El ADN de cada uno de los aislados fue obtenido con un kit comercial de extracción de ADN GeneAll® Exgene™ Plant SV (GeneAll Biotechnology CO, Songpa-gu, Seoul Korea) siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante. La calidad, integridad y pureza del ADN se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa (LCT easyrose I®, LABCITEC S.A. de C.V., Ciudad de México, México) al 0.8 %, teñido con SYBER® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™ Molecular Probes®, Eugene, Oregon USA). El ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría (EPOCH, BioTek® Instruments, Winooski, Vermont, USA).

V.2.2.2 Identificación de *Candida spp.* por PCR (ITS1 – 5.8S – ITS2)

Para la identificación de las especies *Candida guilliermondii* y *Candida parapsilosis* se amplificó por PCR la región ITS1 – 5.8S – ITS2 del gen del rRNA.

Para llevar a cabo la PCR se utilizó una mezcla de reacción (Cuadro 12) con volumen final de 50 µL, las condiciones de la PCR se describen en el Cuadro 13.

Cuadro 12. Mezcla de reacción para la amplificación de la región ITS1 – 5.8S – ITS2 por PCR a un volumen final de 50 µL.

| Reactivo | Concentración final | Volumen [µL] |
|--|---------------------|--------------|
| Buffer de reacción | 1 X | 5 |
| Cloruro de magnesio [MgCl ₂] | 2.0 mM | 4 |
| dATP ^a | 0.25 mM/µL | 1.25 |
| dCTP ^a | 0.25 mM/µL | 1.25 |
| dGTP ^a | 0.25 mM/µL | 1.25 |
| dTTP ^a | 0.25 mM/µL | 1.25 |
| Taq polimerasa ^b | 2.5 U | 0.7 |

| Reactivo | Concentración final | Volumen [μ L] |
|---|---------------------|--------------------|
| ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') ^c | 1 μ M | 5 |
| ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') ^c | 1 μ M | 5 |
| ADN | 100 ng/ μ L | 5 |
| Agua μ Q | - | 20.3 |
| Volumen final | | 50 |

^a Invitrogen®, Carlsbad, California, USA ^b Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/ μ l) Thermo Scientific™, Waltham Massachusetts, USA ^c Sigma-Aldrich®, San Luis, Misuri, USA.

Cuadro 13. Condiciones de la PCR en el termociclador.

| Etapa | Desnaturalización | Alineación | Elongación | Terminación |
|-------------|-------------------|------------|------------|-------------|
| Temperatura | 96 °C | 94 °C | 58 °C | 72 °C |
| Tiempo | 5' | 30'' | 30'' | 5' |
| Ciclos | 1 | 40 | | 1 |

La amplificación de la región ITS1 – 5.8S – ITS2 se verificó mediante electroforesis de un gel de agarosa (LCT easyrose I®, LABCITEC S.A. de C.V., Ciudad de México, México) al 1.5 % teñido con SYBER® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™ Molecular Probes®, Eugene, Oregon USA).

V.2.2.3 Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción

La región ITS1 – 5.8S – ITS2 amplificada en la PCR de todos los aislados fue purificada mediante el kit comercial DNA clean & concentrator™ -5 (Zymo Research Corp, Irvine, California, USA) el cual, posteriormente fue cuantificado mediante espectrofotometría (EPOCH, BioTek® Instruments, Winooski, Vermont, USA); y finalmente sometido a digestión enzimática con la enzima de restricción *MspI* (New England BioLabs® inc, Ipswich, Massachusetts, USA) (Mohammadi, 2013), en una mezcla de reacción con volumen final de 10 μ L (Cuadro 14), las condiciones de reacción se describen en el cuadro 15. La reacción de digestión fue evidenciada por

electroforesis en un gel de agarosa (LCT easyrose I[®], LABCITEC S.A. de C.V., Ciudad de México, México) al 3 % y teñido con GelRed[®] Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, California, USA).

Cuadro 14. Mezcla de reacción para la digestión enzimática con la enzima *MspI*.

| Reactivo | Concentración | Volumen [μ L] |
|---------------------|---------------|----------------------|
| Buffer de digestión | 10 X | 1 |
| Enzima <i>MspI</i> | 20 000 U/ml | 0.5 |
| Producto de PCR | - | Equivalente a 150 ng |
| Agua mQ | - | cbp 10 μ L |
| Volumen final | | 10 |

Cuadro 15. Condiciones de la digestión con la enzima de restricción *MspI*.

| Enzima de restricción | <i>MspI</i> |
|-----------------------|-------------|
| ADN | 150 ng |
| Tiempo | 60 min |
| Temperatura | 37 °C |

La identificación de *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis* se confirmó de acuerdo con lo reportado por Mohammadi & cols. (Cuadro 16)¹²⁹.

Cuadro 16. Patrones de corte específicos para *Candida guilliermondii* y para el complejo *Candida parapsilosis*¹²⁹.

| Especie | Tamaño del amplicón (ITS1- 5.8S - ITS4) (pb) | Tamaño de los fragmentos de la digestión enzimática con <i>MspI</i> (pb) |
|---|--|--|
| <i>Candida guilliermondii</i> | 607 | 82, 155, 370 |
| <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> | 530 | 530 |
| <i>Candida metapsilosis</i> | 531 | 531 |
| <i>Candida orthopsilosis</i> | 510 | 510 |

V.3 Prueba de sensibilidad a los antifúngicos

V.3.1 Microdilución en caldo para levaduras

La sensibilidad a antifúngicos por microdilución en caldo para levaduras (estándar de oro) se realizó siguiendo los lineamientos del documento M27 – A3 emitido por el CLSI⁴¹.

La preparación de las placas de microdilución se realizó a partir de una solución inicial la cual se fue diluyendo de manera seriada (Cuadro 17). Posteriormente, en los pozos de las placas se distribuyeron 100 µL de solución de antifúngico colocando la mayor concentración en los pozos de la columna uno y la menor concentración en los pozos de la columna 10; los pozos 11 y 12 se llenaron con RPMI 1640, ya que son el control de crecimiento y el control de esterilidad, respectivamente⁴¹.

Cuadro 17. Preparación de las diluciones para los distintos antifúngicos solubles e insolubles en agua.

| Antifúngicos solubles en agua (fluconazol y caspofungina) | | | | | | |
|--|-----------------------|----------------|--------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| No. de tubo | Concentración (µg/mL) | Solución madre | Volumen (mL) | Solvente ^a (mL) | Concentración intermedia (µg/mL) | Concentración final 1:10 (µg/mL) |
| 1 | 5120 | Inicial | 1.0 | 7.0 | 640 | 64 |
| 2 | 640 | Tubo 1 | 1.0 | 1.0 | 320 | 32 |
| 3 | | | 1.0 | 3.0 | 160 | 16 |
| 4 | | | 1.0 | 1.0 | 80 | 8 |
| 5 | 160 | Tubo 3 | 0.5 | 1.5 | 40 | 4 |
| 6 | | | 0.5 | 3.5 | 20 | 2 |
| 7 | | | 1.0 | 1.0 | 10 | 1 |
| 8 | 20 | Tubo 6 | 0.5 | 1.5 | 5 | .5 |
| 9 | | | 0.5 | 3.5 | 2.5 | 0.25 |
| 10 | | | 1.0 | 1.0 | 1.25 | 0.125 |
| 11 | 2.5 | Tubo 9 | 0.5 | 1.5 | 0.625 | 0.0625 |
| 12 | | | 0.5 | 3.5 | 0.3125 | 0.03125 |

| Antifúngicos insolubles en agua (posaconazol, anfotericina B, itraconazol y voriconazol) | | | | | | |
|---|-----------------------|----------------|--------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| No. de tubo | Concentración (µg/mL) | Solución madre | Volumen (mL) | Solvente ^a (mL) | Concentración intermedia (µg/mL) | Concentración final 1:10 (µg/mL) |
| 1 | 1600 | Inicial | 1.0 | - | 1600 | 16 |
| 2 | | | | 0.5 | 800 | 8.0 |
| 3 | | | 0.5 | 1.5 | 400 | 4.0 |
| 4 | | | | 3.5 | 200 | 2.0 |
| 5 | | | | 0.5 | 100 | 1.0 |
| 6 | 200 | Tubo 4 | 0.5 | 1.5 | 50 | 0.5 |
| 7 | | | | 3.5 | 25 | 0.25 |
| 8 | | | | 0.5 | 12.5 | 0.125 |
| 9 | 25 | Tubo 7 | 0.5 | 1.5 | 6.25 | 0.0625 |
| 10 | | | | 3.5 | 3.13 | 0.0313 |

^a Para los antifúngicos solubles en agua el solvente es caldo RPMI 1640 y para los antifúngicos insolubles en agua es dimetilsulfóxido (DMSO).

La inoculación de las placas se realizó a partir de una suspensión de la levadura problema a una concentración al 0.5 de McFarland en solución salina isotónica (SSI); posteriormente se transfirieron a razón de 1:100 en caldo RPMI 1640, el volumen de caldo dependió del número de placas a inocular. Las placas de microdilución fueron inoculadas con 100 µL de RPMI 1640 con excepción del pozo 12, al cual se le adicionó caldo RPMI 1640 estéril. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 horas⁴¹.

La sensibilidad por este método fue evaluada para seis antifúngicos: anfotericina B, caspofungina, fluconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol.

Los puntos de corte se establecieron siguiendo los lineamientos del suplemento S4 para los siguientes antifúngicos caspofungina, fluconazol y voriconazol. Los puntos de corte para los antifúngicos no descritos en el suplemento se establecieron de acuerdo con diversos autores (Cuadro 18)^{62, 165, 166}.

Cuadro 18. Puntos de corte establecidos por el Instituto de Estandarización de Laboratorios Clínicos para diferentes antifúngicos y por diversos autores^{41, 62, 165, 166}.

| Antifúngico | Intervalos de las CMI ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|--------------------|--|---------------------|------------|------------|
| | Sensible | S – DD ^a | Intermedio | Resistente |
| Fluconazol | ≤ 8 | 16 – 32 | - | ≥ 64 |
| Itraconazol | $\leq 0,12$ | 0,25 – 0,5 | - | ≥ 1 |
| Voriconazol | ≤ 1 | 2 | - | ≥ 4 |
| 5 - Fluorocitosina | ≤ 4 | - | 8 – 16 | > 32 |
| Caspofungina | ≤ 2 | - | 4 | ≥ 8 |
| Anfotericina B | ≤ 1 | - | - | ≥ 1 |
| Ketoconazol | ≤ 1 | - | - | ≥ 1 |
| Posaconazol | ≤ 2 | - | - | ≥ 2 |

^a Sensible – Dosis dependiente.

V.3.2 Microdilución en caldo (SENSITITRE YeastOne®)

La sensibilidad a antifúngicos por microdilución en caldo mediante el método comercial SENSITITRE YeastOne® (Thermo Scientific™, Birches Industrial Estate, East Grinstead, UK), se realizó siguiendo los lineamientos y los puntos de corte establecidos por el fabricante; éstos últimos basados en lo establecido por el CLSI.

El método consiste en la preparación de una suspensión de la levadura problema en SSI a una concentración del 0.5 de McFarland, posteriormente se transfirieron 20 μL en un tubo con 11 mL de caldo RPMI 1640. Todos los pozos de las placas de microdilución fueron inoculados con 100 μL de la suspensión en RPMI 1640. Las placas fueron incubadas a 35 °C durante 24 horas.

La sensibilidad por este método se evaluó para ocho antifúngicos: anfotericina B, caspofungina, fluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol, ketoconazol y 5-fluorocitosina.

V.4 Análisis estadístico

La actividad de los diversos antifúngicos sobre cada uno de los aislados fue obtenida mediante el procesamiento de los valores de CMI con el software estadístico XLSTAT (Addinsoft, París, Francia), para ambos métodos de microdilución en caldo. Los parámetros fueron media, desviación estándar y varianza. La comparación entre los valores de las medias se realizó mediante la prueba t de *Student* ($p < 0.05$) y el análisis de concordancia mediante la construcción de gráficos Bland-Altman, la diferencia entre los valores de CMI obtenidos por ambos métodos se representó en el eje Y frente al promedio de los valores de CMI por el método de referencia en el eje X.

Para el cálculo del porcentaje de concordancia entre los métodos estudiados se interpretó de la siguiente manera: 1) los valores de CMI estaban en concordancia cuando los valores de CMI fueron idénticos o no están separados más de $\pm 2 \log_2$ de dilución; 2) la discrepancia se interpretó cuando los valores de CMI estaban separados más de $\pm 2 \log_2$ de dilución.

VI. Resultados

VI.1 Pacientes

De enero a diciembre de 2017 se obtuvieron 48 aislados clínicos de *Candida* spp. provenientes de sangre de pacientes pediátricos hospitalizados. En el Cuadro 19 se muestran los datos demográficos y los factores de riesgo asociados a los 12 pacientes del presente estudio; siete correspondieron al género femenino (58.33 %) y cinco al género masculino (41.67 %); el rango de edad fue desde un mes hasta ocho años con tres meses, con un promedio de 21.6 meses.

El factor de riesgo más frecuente fue la administración de nutrición parenteral y la presencia de catéter (100 %); seguido por el tratamiento con antibióticos de amplio espectro (91.67 %), el cual estuvo asociado con infecciones bacterianas en el 66.67 % de los casos.

Del total de los aislados, el 47.92 % correspondieron a *Candida guilliermondii*, principal especie aislada; seguida de *C. albicans* en el 22.92 % de los casos (Figura 13).

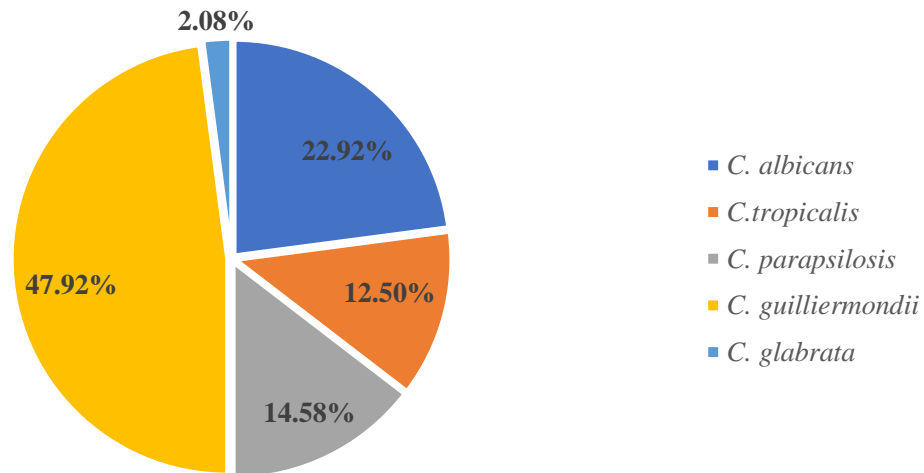


Figura 13. Hemocultivos positivos a *Candida* spp. obtenidos de pacientes pediátricos en el Laboratorio de Parasitología y Micología del Instituto Nacional de Pediatría.

Los aislados de *C. guilliermondii* fueron obtenidos en un periodo de 55 días (29 – junio – 2017 al 22 – agosto – 2017).

Cuadro 19. Datos demográficos y factores de riesgo asociados a 12 pacientes con hemocultivos positivos a *C. guilliermondii*.

| Paciente | Clave | Edad | | Género | Factores de riesgo | | | | | |
|----------|-------------------------|------|-------|--------|--------------------------|----------------------|--------------|----------|-------------|----------------------|
| | | Años | Meses | | Terapia ATB ^a | Infección bacteriana | Desnutrición | Cirugías | Cateterismo | Nutrición Parenteral |
| 1 | 06183 06-08 06-13 | 0 | 2 | F | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ | ✓ |
| 2 | 06185 06-05 | 0 | 1 | M | ✓ | | | | ✓ | ✓ |
| 3 | 06205 07033 | 0 | 3 | F | ✓ | ✓ | | | ✓ | ✓ |
| 4 | 06215 08111 | 5 | 6 | M | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ | ✓ |
| 5 | 06231 07-01 07-06 | 0 | 6 | F | ✓ | ✓ | | | ✓ | ✓ |
| 6 | 06234 | 0 | 4 | M | ✓ | | | | ✓ | ✓ |
| 7 | 06240 06241 | 0 | 9 | M | ✓ | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 8 | 06-07 | 0 | 11 | F | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ | ✓ |
| 9 | 06-10 06-11 | 3 | 0 | M | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 10 | 06-12 06-14 | 1 | 6 | F | ✓ | ✓ | | | ✓ | ✓ |
| 11 | 07-10 | 8 | 3 | F | | | | | ✓ | ✓ |
| 12 | 06-15 | 0 | 4 | F | ✓ | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ |

^a Antibióticos de amplio espectro.

VI. 2 Identificación

VI. 2.1 Identificación fenotípica

De los 22 aislados clínicos procesados y posterior al cultivo monospórico en CHROMagar Candida®, se obtuvieron 24 aislados, de los cuales 20 correspondieron a colonias de color lila, lisas y brillantes, dos a colonias de color rosa pálido, lisas y mate y dos a colonias de color rosa pálido, rugosas y mate (Cuadro 20). En dos de los aislados (06231 y 07-01) se observó asociación de especies (Figura 14).



Figura 14. Asociación de especies en CHROMagar Candida®. Se observan colonias rugosas de color blanco/rosa pálido correspondientes a *C. parapsilosis* y colonias lisas de color lila a *C. guilliermondii*.

Cuadro 20. Morfología colonial e identificación presuntiva de los 24 aislados clínicos en CHROMagar Candida®.

| Número | Clave | Morfología colonial | | | | Identificación |
|--------|----------|---------------------|---------------------|---------|------------|-------------------------------|
| | | Color | Código ^a | Textura | Superficie | |
| 1 | 06183 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 2 | 06185 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 3 | 06205 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 4 | 06215 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 5 | 06231 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 6 | 06231.1 | Rosa pálido | 9263 C | Rugosa | Mate | <i>Candida parapsilosis</i> |
| 7 | 06234 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 8 | 06240 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 9 | 06241 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 10 | 07033 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 11 | 08111 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 12 | 06 – 05 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 13 | 06 – 08 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 14 | 06 – 07 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 15 | 06 – 10 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 16 | 06 – 11 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 17 | 06 – 12 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 18 | 06 – 13 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 19 | 06 – 15 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 20 | 06 – 14 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 21 | 07 – 01 | Lila | 7652 UP | Lisa | Brillante | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 22 | 07– 01.1 | Rosa pálido | 9263 C | Rugosa | Mate | <i>Candida parapsilosis</i> |
| 23 | 07 – 06 | Rosa pálido | 9263 C | Lisa | Mate | <i>Candida parapsilosis</i> |
| 24 | 07 – 10 | Rosa pálido | 9263 C | Lisa | Mate | <i>Candida parapsilosis</i> |

^a El código de color utilizado corresponde al código Pantone®.

De los 24 aislados obtenidos en CHROMagar Candida®, el 83.33 % creció en presencia de cicloheximida; asimismo todos presentaron formación de pseudohifas en agar fécula de papa – zanahoria con tween 80 al 1.0 % (Cuadro 21).

Cuadro 21. Identificación fenotípica de los 24 aislados en ADS – CC en agar fécula de papa – zanahoria con tween al 1 %.

| Número | Clave | Crecimiento en presencia cicloheximida | Formación de pseudohifas |
|---------------|--------------|---|---------------------------------|
| 1 | 06183 | Positivo | Positivo |
| 2 | 06185 | Positivo | Positivo |
| 3 | 06205 | Positivo | Positivo |
| 4 | 06215 | Positivo | Positivo |
| 5 | 06231 | Positivo | Positivo |
| 6 | 06231.1 | Negativo | Positivo |
| 7 | 06234 | Positivo | Positivo |
| 8 | 06240 | Positivo | Positivo |
| 9 | 06241 | Positivo | Positivo |
| 10 | 07033 | Positivo | Positivo |
| 11 | 08111 | Positivo | Positivo |
| 12 | 06 – 05 | Positivo | Positivo |
| 13 | 06 – 08 | Positivo | Positivo |
| 14 | 06 – 07 | Positivo | Positivo |
| 15 | 06 – 10 | Positivo | Positivo |
| 16 | 06 – 11 | Positivo | Positivo |
| 17 | 06 – 12 | Positivo | Positivo |
| 18 | 06 – 13 | Positivo | Positivo |
| 19 | 06 – 15 | Positivo | Positivo |
| 20 | 06 – 14 | Positivo | Positivo |
| 21 | 07 – 01 | Positivo | Positivo |
| 22 | 07 – 01.1 | Negativo | Positivo |
| 23 | 07 – 06 | Negativo | Positivo |
| 24 | 07 – 10 | Negativo | Positivo |

Las características macro y microscópicas de *Candida guilliermondii* se muestran en la Figura 15; en la Figura 16 y 17 se presenta las características morfológicas de las dos variedades de *Candida parapsilosis*.

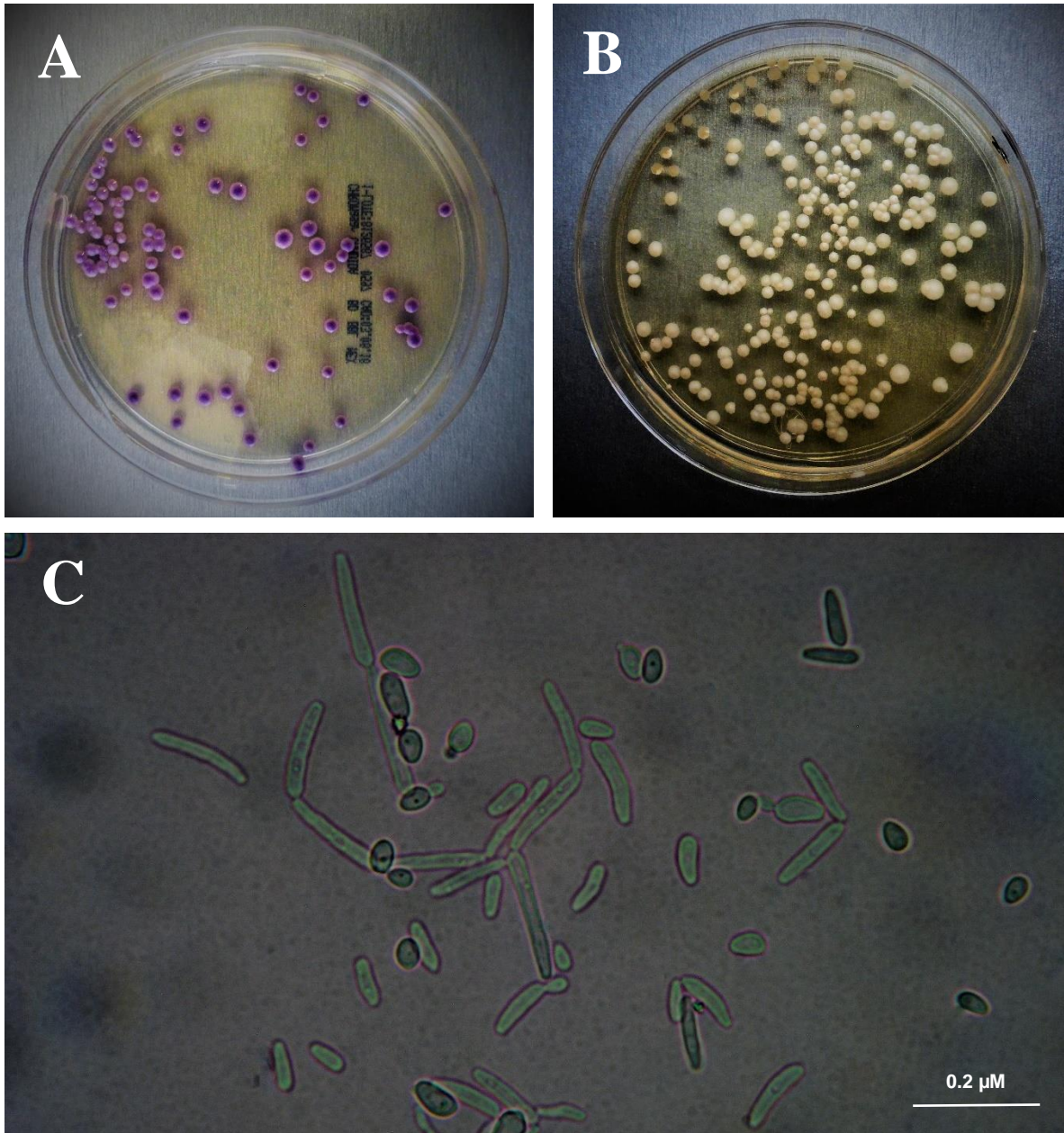


Figura 15. *Candida guilliermondii* (08111). (A) CHROMagar Candida®, colonias lilas de superficie lisa y brillantes. (B) Agar dextrosa Sabouraud, colonias cremosas de color blanco, de superficie lisa y brillante. (C) Pseudohifas alargadas y ramificadas después de 24 horas de incubación.

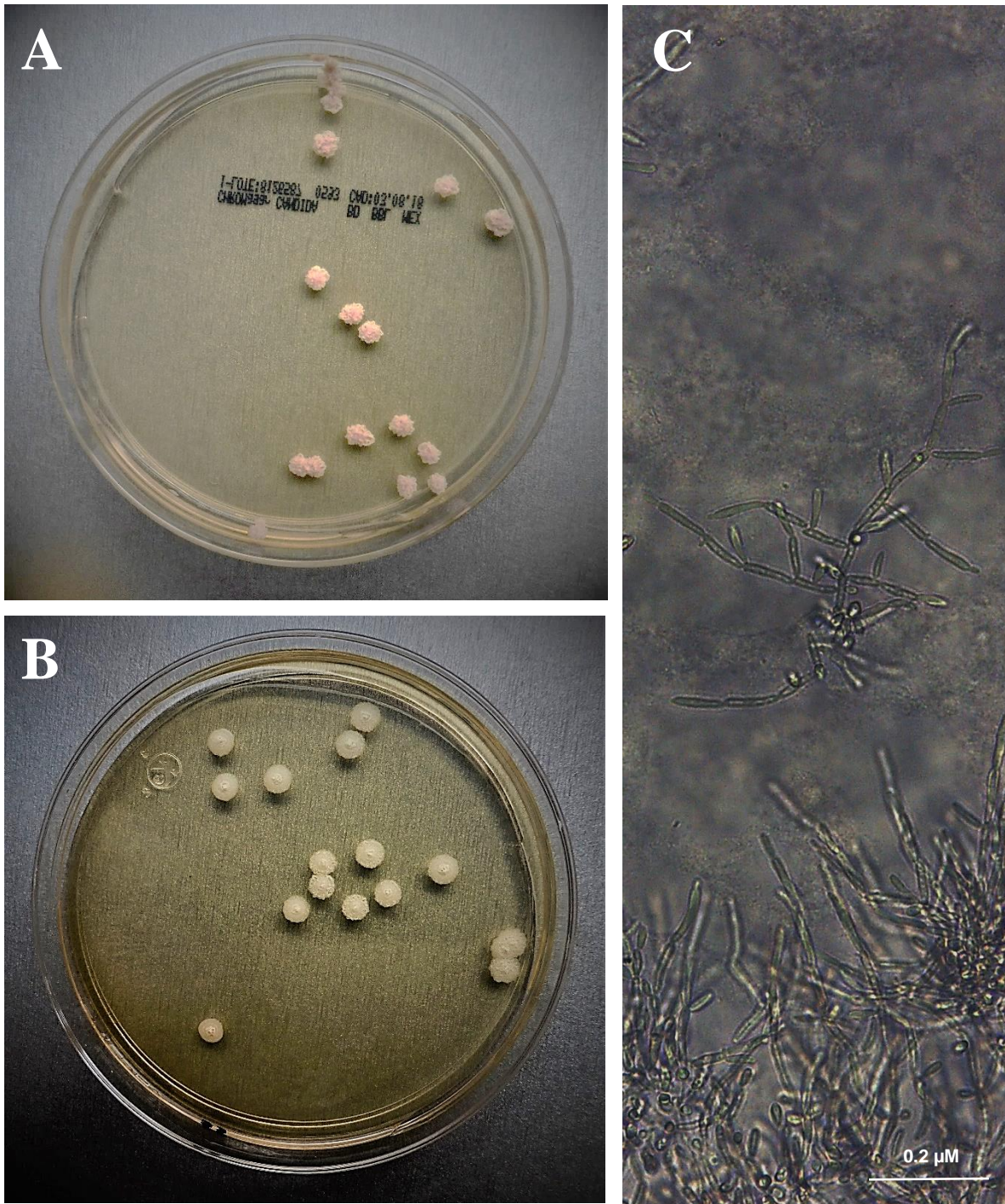


Figura 16. *Candida parapsilosis* (07 – 01.1) (A) CHROMagar Candida®, colonias de color rosa pálido de superficie rugosa y mate. (B) Agar dextrosa Sabouraud, colonias cremosas de color blanco de superficie rugosa y mate. (C) Pseudohifas alargadas y ramificadas, después de 72 horas de incubación.

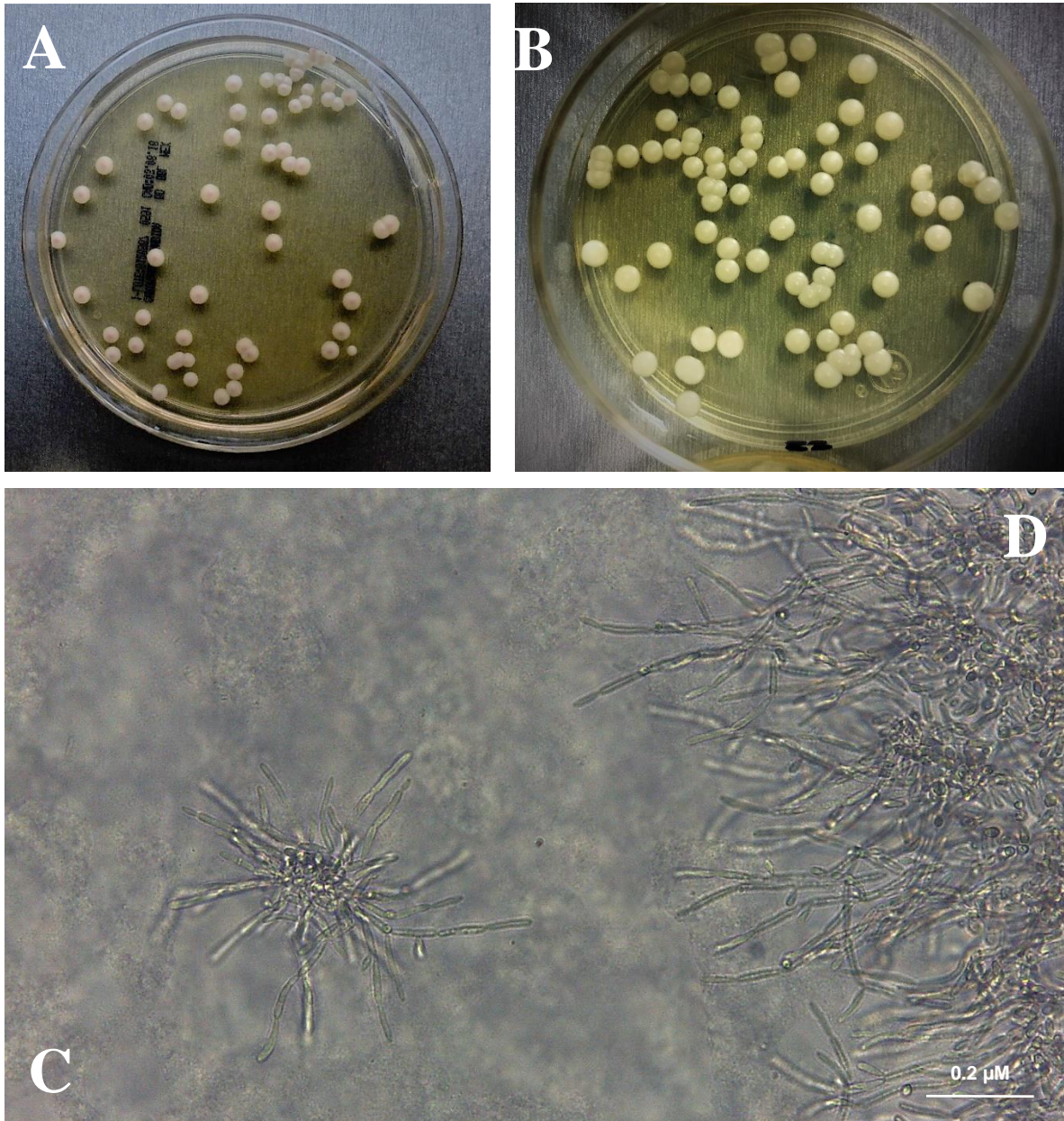


Figura 17. *Candida parapsilosis*. (A) CHROMagar Candida®, colonias de color rosa pálido de superficie lisa y mate. (B) Agar dextrosa Sabouraud, colonias cremosas de color blanco de superficie lisa y mate. (C) Pseudohifas alargadas y ramificadas a partir de un cúmulo central en crecimiento aracniforme. (D) Pseudohifas alargadas y ramificadas en crecimiento arboriforme.

Después del análisis de las pruebas fenotípicas y bioquímicas, 20 de los aislados fueron identificados como *Candida guilliermondii* y cuatro como *Candida parapsilosis*.

VI. 2.1 Identificación molecular

A todos los aislados se les realizó identificación molecular mediante el empleo de PCR y digestión enzimática con la enzima de restricción *MspI* (Cuadro 23). En la Figura 18 se muestra el ADN extraído inicialmente en un gel de agarosa.

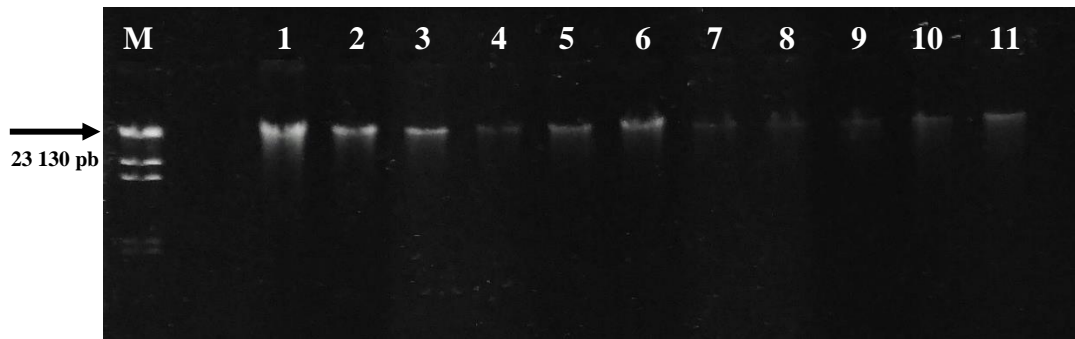


Figura 18. Gel de agarosa al 0.8 % teñido con SYBER® DNA Gel Stain para visualizar la integridad del ADN extraído. (M) Marcador Lambda DNA *HindIII*, (1 – 11) Bandas de ADN extraído correspondiente a once de los aislados.

En la Figura 19 se observa el gel de agarosa de la amplificación por PCR de la región ITS1 – 5.8S – ITS2 de nueve aislados identificados fenotípicamente como *C. guilliermondii*; el fragmento correspondió aproximadamente a 600 pb.

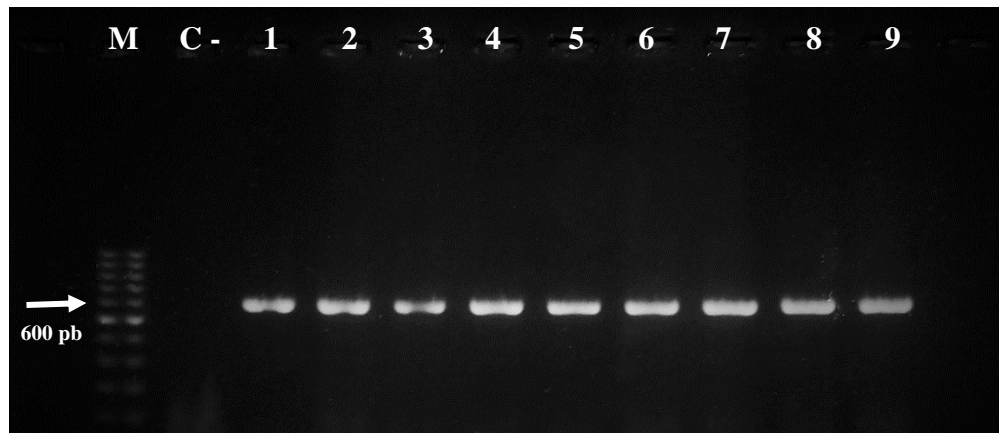


Figura 19. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con SYBER® DNA Gel Stain que muestra el producto amplificado (ITS1 – 5.8S – ITS2) de algunos aislados. (M) Marcador de peso molecular 100 pb, (C -) Control negativo, (1 – 9) Bandas de aproximadamente 600 pb correspondientes al producto de amplificación de nueve aislados.

La identificación final de los 20 aislados de *C. guilliermondii* se realizó por la presencia de tres bandas de aproximadamente 370, 155 y 82 pb posterior a la digestión enzimática con la enzima de restricción *MspI* (Figura 20).

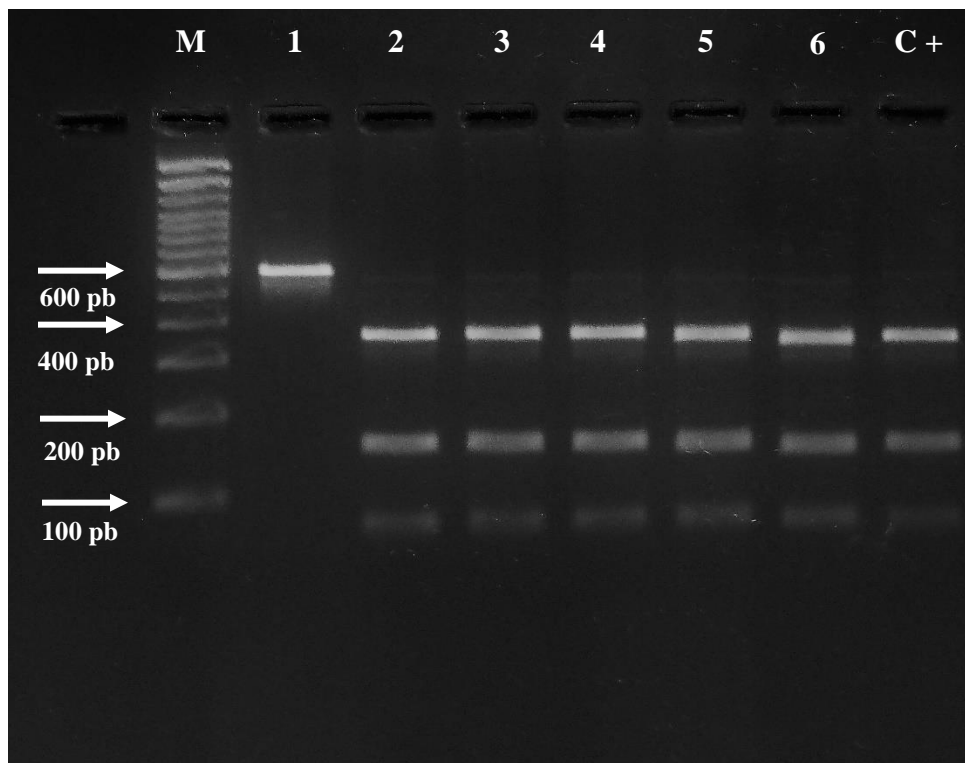


Figura 20. Gel de agarosa al 3.0 % del RFLP con la enzima de restricción *MspI* teñido con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain para la identificación de *C. guilliermondii*. (M) Marcador de peso molecular de 100 pb, (1) Fragmento de aproximadamente 600 pb, amplicón sin digerir, (2 – 6) Fragmentos de aproximadamente 82, 155 y 370 pb correspondientes a cinco aislados de *C. guilliermondii*. (C +) Control positivo correspondiente a la cepa ATCC® 6260 *Meyerozyma guilliermondii*.

La identificación final de *C. parapsilosis* fue mediante la presencia de una banda de aproximadamente 500 pb posterior a la digestión enzimática con *MspI* (Figura 21).

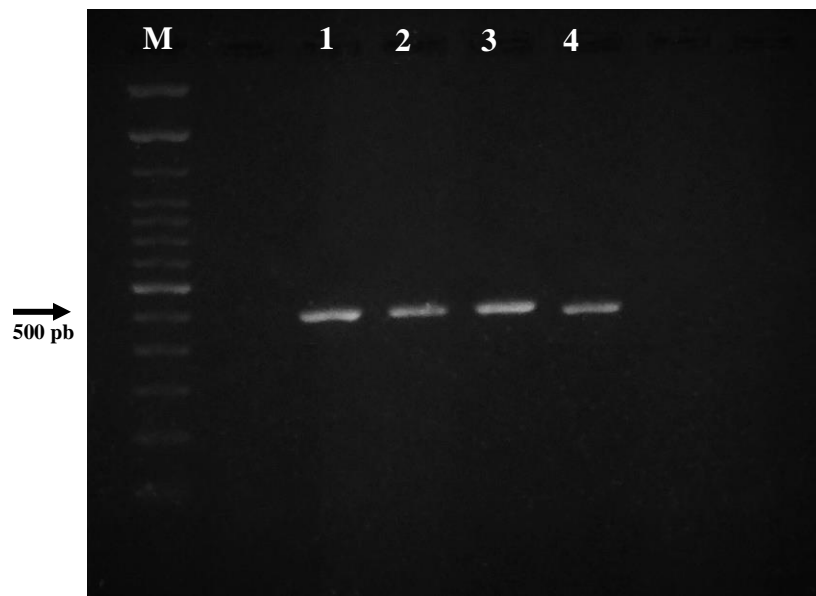


Figura 21. Gel de agarosa al 3.0 % del RFLP con la enzima de restricción *MspI* teñido con SYBER® DNA Gel Stain para la identificación de *C. parapsilosis* (M) Marcador de peso molecular de 100 pb, (1 – 4) Fragmentos de aproximadamente 500 pb correspondientes a cuatro aislados *C. parapsilosis*.

En el Cuadro 22 se presenta la identificación final por métodos moleculares de los 24 aislados de *Candida* spp. basado en los fragmentos del amplicón correspondientes.

Cuadro 22. Identificación final de los 24 aislados de *Candida guilliermondii*/*Candida parapsilosis* mediante la digestión de la región ITS1 – 5.8S – ITS2 con la enzima *MspI*.

| Número | Clave | Digestión enzimática (Bandas) | | | | Identificación |
|--------|---------|-------------------------------|--------|--------|-------|-------------------------------|
| | | 510 – 530 pb | 370 pb | 155 pb | 82 pb | |
| 1 | 06183 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 2 | 06185 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 3 | 06205 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 4 | 06215 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 5 | 06231 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 6 | 06231.1 | ✓ | | | | <i>Candida parapsilosis</i> |

| Número | Clave | Digestión enzimática (Bandas) | | | | Identificación |
|--------|-----------|-------------------------------|--------|--------|-------|-------------------------------|
| | | 510 – 530 pb | 370 pb | 155 pb | 82 pb | |
| 7 | 06234 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 8 | 06240 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 9 | 06241 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 10 | 07033 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 11 | 08111 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 12 | 06 – 05 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 13 | 06 – 08 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 14 | 06 – 07 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 15 | 06 – 10 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 16 | 06 – 11 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 17 | 06 – 12 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 18 | 06 – 13 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 19 | 06 – 15 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 20 | 06 – 14 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 21 | 07 – 01 | | ✓ | ✓ | ✓ | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 22 | 07 – 01.1 | ✓ | | | | <i>Candida parapsilosis</i> |
| 23 | 07 – 06 | ✓ | | | | <i>Candida parapsilosis</i> |
| 24 | 07 – 10 | ✓ | | | | <i>Candida parapsilosis</i> |

VI.3 Prueba de sensibilidad a los antifúngicos

En todos los aislados fue evaluado el perfil de sensibilidad a antifúngicos por el método de referencia de microdilución en caldo (M27 – A3) y SENSITITRE YeastOne®. En el Cuadro 23 se presenta las CMI obtenidas por ambos métodos.

Cuadro 23. Concentración mínima inhibitoria obtenida de los seis antifúngicos sobre los 24 aislados por el método de referencia de microdilución en caldo (M27 – A3) y por SENSITITRE YeastOne®.

| Número | Clave | M 27 – A3 | | | | | |
|-------------|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | PSZ ^a | AMB ^b | FLZ ^c | ITZ ^d | VCZ ^e | CSP ^f |
| CMI [µg/mL] | | | | | | | |
| 1 | 06183 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.06 | 0.03 | 0.25 |
| 2 | 06185 | 0.03 | 0.25 | 0.5 | 0.5 | 0.03 | 0.5 |
| 3 | 06205 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.25 | 0.03 | 0.5 |
| 4 | 06215 | 0.03 | 0.125 | 0.5 | 0.25 | 0.03 | 0.5 |
| 5 | 06231 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.25 | 0.03 | 0.5 |
| 6 | 06231.1 | 0.03 | 0.25 | 0.25 | 0.06 | 0.03 | 0.25 |
| 7 | 06234 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.25 | 0.03 | 0.5 |
| 8 | 06240 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.25 | 0.03 | 0.5 |
| 9 | 06241 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.25 | 0.03 | 0.5 |
| 10 | 07033 | 0.03 | 0.125 | 0.5 | 0.25 | 0.03 | 0.5 |
| 11 | 08111 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.25 | 0.03 | 0.5 |
| 12 | 06 – 05 | 0.03 | 0.5 | 0.125 | 0.06 | 0.03 | 0.5 |
| 13 | 06 – 08 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.06 | 0.03 | 0.25 |
| 14 | 06 – 07 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.06 | 0.03 | 0.25 |
| 15 | 06 – 10 | 0.03 | 0.125 | 0.5 | 0.25 | 0.03 | 0.5 |
| 16 | 06 – 11 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.06 | 0.03 | 0.5 |
| 17 | 06 – 12 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.25 | 0.03 | 0.5 |
| 18 | 06 – 13 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.25 | 0.03 | 0.5 |
| 19 | 06 – 14 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.06 | 0.03 | 0.25 |
| 20 | 06 – 15 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.06 | 0.03 | 0.25 |
| 21 | 07 – 01 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.25 | 0.03 | 0.5 |
| 22 | 07 – 01.1 | 0.03 | 0.25 | 0.25 | 0.06 | 0.03 | 0.25 |
| 23 | 07 – 06 | 0.03 | 0.125 | 0.25 | 0.06 | 0.03 | 0.25 |
| 24 | 07 – 10 | 0.03 | 0.25 | 0.25 | 0.06 | 0.03 | 0.25 |

| SENSITITRE YeastOne® | | | | | | | |
|----------------------|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Número | Clave | PSZ ^a | AMB ^b | FLZ ^c | ITZ ^d | VCZ ^e | CSP ^f |
| | | CMI [µg/mL] | | | | | |
| 1 | 06183 | 0.06 | 0.12 | 4.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 2 | 06185 | 0.06 | 0.12 | 4.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 3 | 06205 | 0.06 | 0.12 | 2.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 4 | 06215 | 0.03 | 0.06 | 4.0 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |
| 5 | 06231 | 0.03 | 0.06 | 4.0 | 0.06 | 0.06 | 0.25 |
| 6 | 06231.1 | 0.03 | 0.5 | 1.0 | 0.06 | 0.015 | 0.25 |
| 7 | 06234 | 0.06 | 0.12 | 2.0 | 0.12 | 0.03 | 0.12 |
| 8 | 06240 | 0.06 | 0.12 | 4.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 9 | 06241 | 0.06 | 0.12 | 4.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 10 | 07033 | 0.03 | 0.12 | 2.0 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |
| 11 | 08111 | 0.06 | 0.12 | 4.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 12 | 06 – 05 | 0.03 | 0.12 | 4.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 13 | 06 – 08 | 0.12 | 0.12 | 2.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 14 | 06 – 07 | 0.12 | 0.12 | 4.0 | 0.25 | 0.12 | 0.25 |
| 15 | 06 – 10 | 0.06 | 0.12 | 4.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 16 | 06 – 11 | 0.06 | 0.12 | 4.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 17 | 06 – 12 | 0.06 | 0.12 | 2.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 18 | 06 – 13 | 0.06 | 0.12 | 4.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 19 | 06 – 14 | 0.06 | 0.12 | 4.0 | 0.12 | 0.06 | 0.12 |
| 20 | 06 – 15 | 0.03 | 0.12 | 2.0 | 0.06 | 0.03 | 0.25 |
| 21 | 07 – 01 | 0.12 | 0.12 | 4.0 | 0.12 | 0.06 | 0.25 |
| 22 | 07 – 01.1 | 0.06 | 0.5 | 1.0 | 0.06 | 0.015 | 0.5 |
| 23 | 07 – 06 | 0.03 | 0.25 | 1.0 | 0.06 | 0.015 | 0.5 |
| 24 | 07 – 10 | 0.03 | 0.5 | 1.0 | 0.06 | 0.015 | 0.5 |

^a Posaconazol, ^b Anfotericina B, ^c Fluconazol, ^d Itraconazol, ^e Voriconazol, ^f Caspofungina

Los 24 aislados fueron sensibles a todos los antifúngicos por ambos métodos de microdilución en caldo, con excepción de itraconazol, en el cual el 54.17 % y el 4.17 % presentaron valores de CMI que correspondieron a sensible dosis dependiente (S-DD) por el método de referencia (M27-A3) y por el método SENSITITRE YeastOne®, respectivamente.

El método SENSITITRE YeastOne®, además de los antifúngicos mencionados contiene ketoconazol y 5 – fluorocitosina. Todos los aislados fueron clasificados como sensibles para ambos antifúngicos con un rango de 0.008 – 0.03 µg/mL para ketoconazol y > 0.03 µg/mL para 5 – fluorocitosina.

Para cada especie de *Candida* evaluada se obtuvieron los parámetros estadísticos de media, desviación estándar y varianza con cada antifúngico evaluado (Cuadro 24).

Cuadro 24. Valores estadísticos de CMI para cada especie por ambos métodos de microdilución en caldo.

| M27-A3 | | | | | | |
|------------------------------|-------------------------------|------------------------|----------|-----------------------------|------------------------|----------|
| Especie de <i>Candida</i> | <i>Candida guilliermondii</i> | | | <i>Candida parapsilosis</i> | | |
| | CMI ^a [µg/mL] | | | CMI ^a [µg/mL] | | |
| Antifúngicos | Media | Desviación estándar | Varianza | Media | Desviación estándar | Varianza |
| Posaconazol | 0.0300 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0300 | 0.0000 | 0.0000 |
| Anfotericina B | 0.1500 | 0.0870 | 0.0076 | 0.0600 | 0.0000 | 0.0000 |
| Fluconazol | 0.2938 | 0.1094 | 0.0120 | 0.2500 | 0.0000 | 0.0000 |
| Itraconazol | 0.1960 | 0.1163 | 0.0135 | 0.0300 | 0.0000 | 0.0000 |
| Voriconazol | 0.0300 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2188 | 0.0625 | 0.0039 |
| Caspofungina | 0.4375 | 0.1111 | 0.0123 | 0.2500 | 0.0000 | 0.0000 |

| SENSITITRE YeastOne® | | | | | | |
|---------------------------|-------------------------------|---------------------|----------|-----------------------------|---------------------|----------|
| Especie de <i>Candida</i> | <i>Candida guilliermondii</i> | | | <i>Candida parapsilosis</i> | | |
| | CMI ^a [µg/mL] | | | CMI ^a [µg/mL] | | |
| Antifúngicos | Media | Desviación estándar | Varianza | Media | Desviación estándar | Varianza |
| Posaconazol | 0.0615 | 0.0283 | 0.0008 | 0.0375 | 0.0150 | 0.0002 |
| Anfotericina B | 0.1140 | 0.0185 | 0.0003 | 0.4375 | 0.1250 | 0.0156 |
| Fluconazol | 3.400 | 0.9403 | 0.0016 | 1.000 | 0.0000 | 0.0000 |
| Itraconazol | 0.1145 | 0.0402 | 0.0016 | 0.0600 | 0.0000 | 0.0000 |
| Ketoconazol | 0.0119 | 0.0055 | 0.0001 | 0.0170 | 0.0093 | 0.0001 |
| 5 – Fluorocitosina | 0.0300 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1375 | 0.0802 | 0.0064 |
| Voriconazol | 0.0600 | 0.0169 | 0.0003 | 0.015 | 0.0000 | 0.0000 |
| Caspofungina | 0.2115 | 0.0701 | 0.0049 | 0.4375 | 0.1250 | 0.0156 |

^a Concentración mínima inhibitoria

El antifúngico que mostró la mayor actividad frente a *Candida guilliermondii* fue voriconazol con una CMI promedio de 0.03 µg/mL por el método de referencia y con una CMI promedio de 0.06 µg/mL por el método SENSITITRE YeastOne®; seguido de posaconazol quien mostró valores promedio de 0.03 µg/mL por el método de referencia y 0.0615 µg/mL por SENSITITRE YeastOne®. Sin embargo, las medias de los antifúngicos fueron comparadas mediante una t de *Student*, los valores de p obtenidos demostraron que no había diferencia significativa entre las CMI de ambos antifúngicos tanto por el método de referencia (valor-p = 1.000) como por SENSITITRE YeastOne® (valor-p = 0.771) por lo que se considera que ambos antifúngicos tuvieron la mayor actividad sobre *C. guilliermondii* (Figura 22).

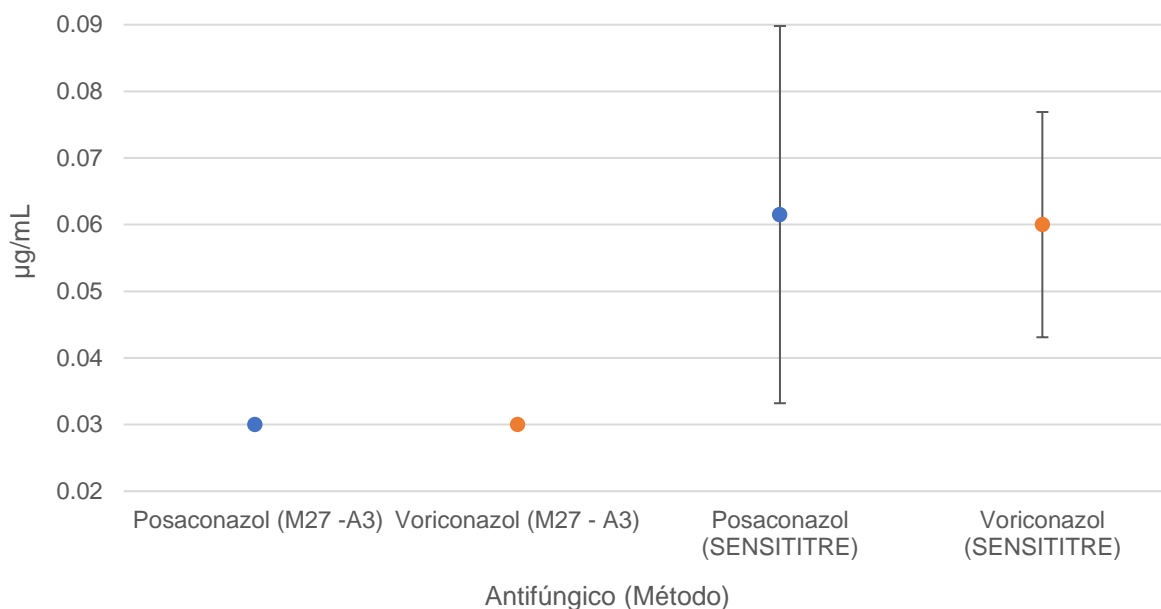


Figura 22. Representación gráfica de las medias de CMI para posaconazol y voriconazol por ambos métodos de microdilución en caldo sobre *Candida guilliermondii*. Las medias de CMI entre posaconazol y voriconazol no presentaron diferencia significativa.

Para describir el grado de concordancia entre los métodos se construyó un diagrama de Bland-Altman para cada antifúngico evaluado.

Los límites de acuerdo esperados se calcularon como $\pm 2 \log_2$ de dilución a partir de la media de los valores de CMI del método de referencia para cada antifúngico. De acuerdo con el CLSI las variaciones entre resultados de CMI de hasta $\pm 2 \log_2$ de dilución no son significativas, por lo que los límites de acuerdo esperados tienen dicho margen de error a partir de la media calculada para el método de referencia; entonces, si los límites de acuerdo calculados y las diferencias entre valores de CMI obtenidos por SENSITITRE YeastOne® no distan más de $\pm 2 \log_2$ de dilución, dichos valores son concordantes con el método de referencia M27 – A3 (Cuadro 25).

Cuadro 25. Comparación de los límites de acuerdo esperados (diferencias máximas aceptables) y los límites de acuerdo calculados para los gráficos de Bland-Altman.

| Antifúngico | Límite de acuerdo esperado ($\mu\text{g/mL}$) | Límite de acuerdo calculado ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------------------|---|--|
| Posaconazol | 0.120 | 0.087 |
| | - 0.060 | - 0.024 |
| Anfotericina B | 0.600 | 0.140 |
| | - 0.300 | - 0.203 |
| Fluconazol | 1.1752 | 4.959 |
| | -0.5876 | 1.254 |
| Itraconazol | 0.784 | 0.179 |
| | - 0.392 | - 0.334 |
| Voriconazol | 0.120 | 0.063 |
| | - 0.060 | - 0.003 |
| Caspofungina | 1.750 | 0.043 |
| | - 0.875 | - 0.495 |

El gráfico de Bland-Altman para posaconazol muestra una buena concordancia debido a que las diferencias entre los valores de CMI y los límites de acuerdo calculados están dentro de los límites de acuerdo esperados (Figura 23).

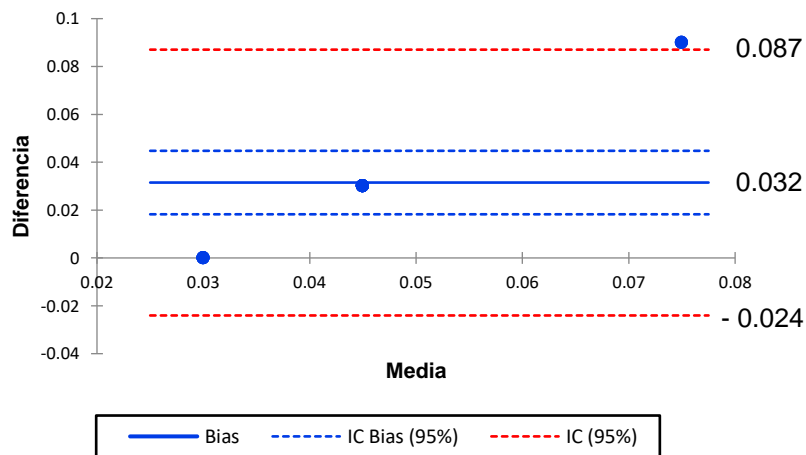


Figura 23. Gráfico de Bland-Altman para los valores de CMI para posaconazol. El valor del sesgo (*bias*) muestra que tan alejados están los valores entre los métodos, para el caso particular de posaconazol se muestra que en promedio con el método SENSITITRE YeastOne® se obtienen valores de CMI mayores en 0.032 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al método de referencia (M27 – A3).

El gráfico Bland-Altman para anfotericina B muestra una excelente concordancia debido a que el sesgo entre los métodos es muy cercano a cero, es decir, la gran mayoría de los valores de CMI son iguales en ambos métodos de microdilución en caldo. Además, los límites de acuerdo calculados están muy por debajo de los límites de acuerdo esperados; la cercanía entre los límites es otro indicador de la buena correlación entre los métodos (Figura 24).

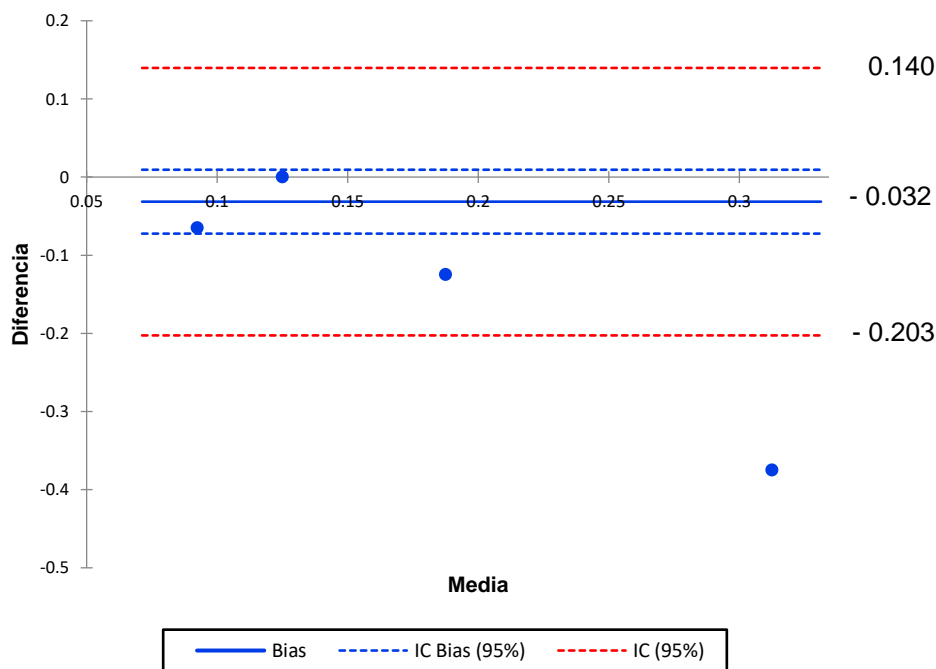


Figura 24. Gráfico de Bland-Altman para los valores de CMI para anfotericina B. El valor del sesgo para anfotericina B muestra que en promedio con el método SENSITITRE YeastOne® se obtienen valores de CMI menores en 0.032 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con respecto al método de referencia (M27 – A3).

El gráfico de Bland-Altman para fluconazol muestra que no hay concordancia entre los métodos debido a que el sesgo entre los valores de CMI es amplio, la diferencia entre valores es mayor $\pm 2 \log_2$ de dilución. Además, el límite de acuerdo calculado superior supera al límite de acuerdo esperado superior por lo que la diferencia entre los valores de CMI es significativa (Figura 25).

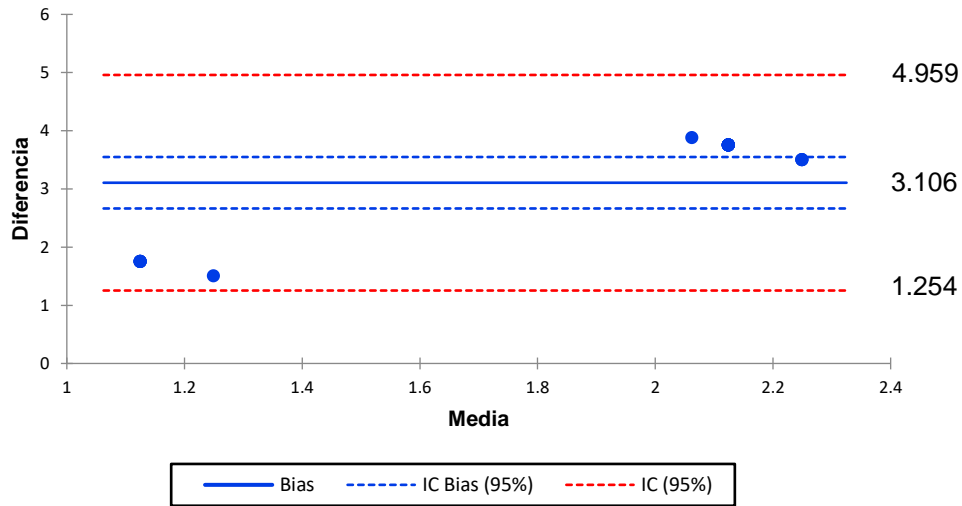


Figura 25. Gráfico de Bland-Altman para los valores de CMI para fluconazol. El valor del sesgo para fluconazol muestra que en promedio con el método SENSITITRE YeastOne® se obtienen valores de CMI mayores en 3.106 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con respecto al método de referencia (M27 – A3).

El gráfico de Bland-Altman para itraconazol muestra buena concordancia entre los valores de CMI del método de referencia M27 – A3 y SENSITITRE YeastOne®; los valores de los límites de concordancia calculados son menores que los límites de concordancia esperados por lo que las diferencias entre los valores de CMI son aceptables (Figura 26).

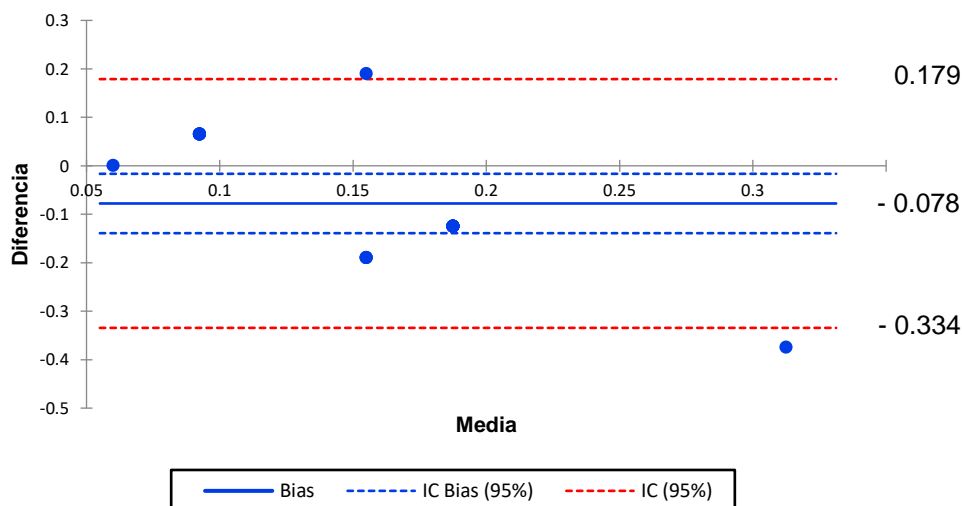


Figura 26. Gráfico de Bland-Altman para los valores de CMI para itraconazol. El valor del sesgo para itraconazol muestra que en promedio con el método SENSITITRE YeastOne® se obtienen valores de CMI menores en 0.078 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con respecto al método de referencia (M27 – A3).

El gráfico de Bland-Altman para voriconazol muestra buena concordancia entre los métodos, los valores de los límites de concordancia calculados son menores que los límites de concordancia esperados por lo que las diferencias de CMI entre los métodos no son significativas (Figura 27).

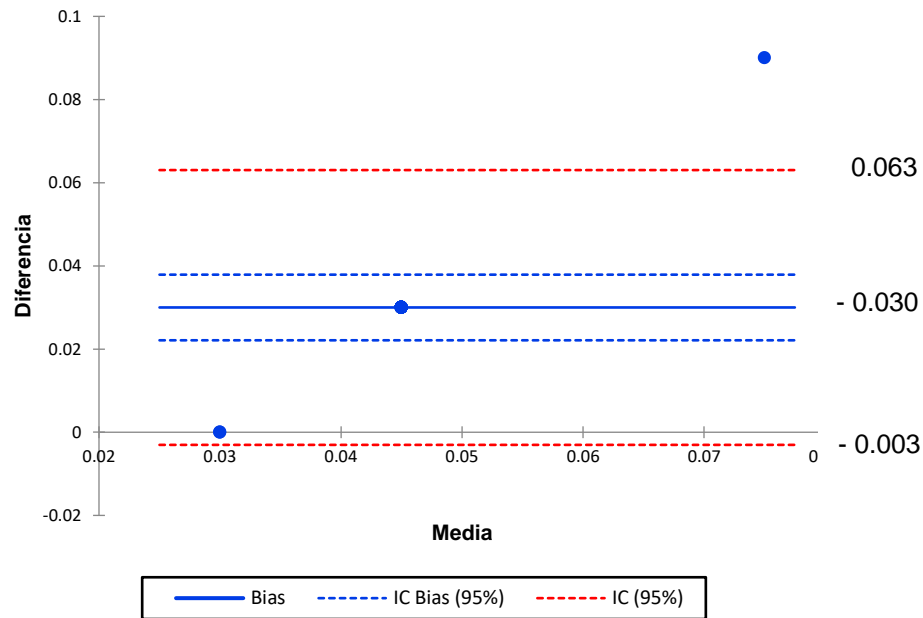


Figura 27. Gráfico de Bland-Altman para los valores de CMI para voriconazol. El valor del sesgo para voriconazol muestra que en promedio con el método SENSITITRE YeastOne® se obtienen valores de CMI mayores en 0.03 µg/mL con respecto al método de referencia (M27 – A3).

El gráfico de Bland-Altman para caspofungina muestra buena concordancia entre los métodos, los valores de los límites de concordancia calculados son menores que los límites de concordancia esperados, los valores de CMI no distan más de $\pm 2 \log_2$ de dilución entre los métodos. (Figura 28)

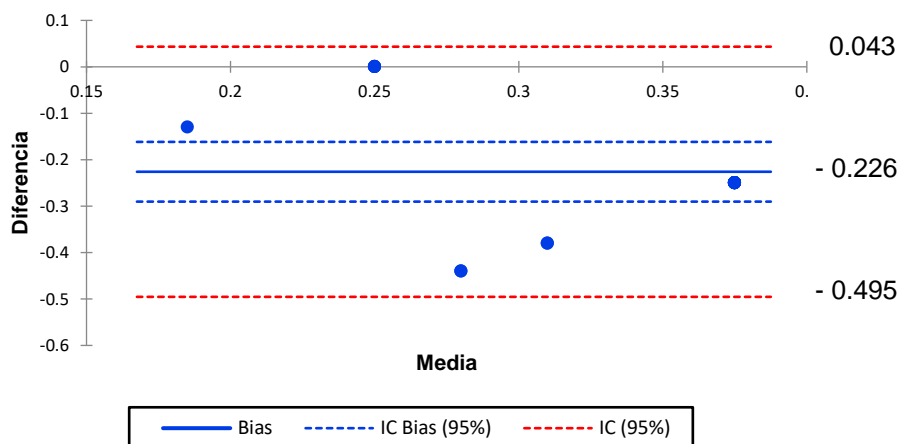


Figura 28. Gráfico de Bland-Altman para los valores de CMI para caspofungina. El valor del sesgo para caspofungina muestra que en promedio con el método SENSITITRE YeastOne® se obtienen valores de CMI menores en 0.226 $\mu\text{g/mL}$ con respecto al método de referencia (M27 – A3).

La mejor concordancia entre valores de CMI la presentó anfotericina B debido a la cercanía del sesgo con cero; seguido por itraconazol. Fluconazol fue el único antifúngico que no mostró concordancia en los valores de CMI entre ambos métodos.

En el Cuadro 26 se presentan los datos del análisis entre las diferencias de los valores de CMI entre los métodos para cada antifúngico. En general, se mostró buena concordancia entre los valores de CMI obtenidos entre el método de referencia M27 – A3 y SENSITITRE YeastOne® en cinco de los seis antifúngicos evaluados, por lo que la concordancia global entre los métodos fue de 81.67 %.

Cuadro 26. Concordancia entre el método de referencia M27 – A3 y SENSITITRE YeastOne® de acuerdo con las diferencias de los valores de CMI.

| Antifúngico | Concordancia (%) |
|----------------|------------------|
| Posaconazol | 100 |
| Anfotericina B | 100 |
| Fluconazol | 0 |
| Itraconazol | 100 |
| Voriconazol | 100 |
| Caspofungina | 90 |
| Promedio | 81.67 |

VII. Discusión

La candidosis hematógena es una de las patologías intrahospitalarias causadas por hongos levaduriformes con mayor incidencia, la cual ha tenido un aumento en los últimos 30 años⁷². *Candida albicans* sigue siendo la principal especie; sin embargo, en la última década se ha observado un incremento en la frecuencia de especies distintas a *C. albicans* e incluso en algunos centros hospitalarios el porcentaje de aislamiento de estas especies ha superado el de *C. albicans* lo cual se ha relacionado con la región geográfica y a la forma clínica de la candidosis^{106, 186}. Cornistein & cols. publicaron en 2013 un estudio en el cual la frecuencia de especies distintas de *C. albicans* fue del 54.52 % con respecto al 43.3 % de *C. albicans* a partir de diferentes especímenes; en particular de los 40 aislados de sangre el 75 % correspondió a este grupo de especies⁴³. En el presente estudio el aislamiento de especies distintas a *C. albicans* fue del 77.08 % superando por más del doble el porcentaje de aislamiento de *C. albicans* (22.92 %). Diversos estudios en población pediátrica han reportado variación en los porcentajes de aislamiento de las diferentes especies de *Candida*, como lo publicaron García & cols. en 2013, donde la especie que predominó fue *C. parapsilosis* en el 43 % de los aislados mientras que *C. albicans* apareció en el 36 % de los casos⁷⁸; por el contrario, en la publicación de Charsizadeh & cols. de 2018, predominó *C. albicans* en el 57.1 % de los casos³⁷.

Por otro lado, la emergencia de especies diferentes de *C. albicans* está relacionada con diversos factores de riesgo como neutropenia, estancias hospitalarias prolongadas, cirugías, tratamientos invasivos, uso de antibióticos de amplio espectro y de alimentación parenteral^{16, 21}; además de la presencia de microorganismos en las superficies de las distintas áreas hospitalarias, ya que se puede transferir al hospedero por colonización de catéteres y dispositivos intravasculares, o bien debido a transmisión cruzada a través de las manos del personal médico y paramédico. Algunos autores han demostrado que las especies de *Candida* son capaces de permanecer hasta 45 minutos en las manos del personal sanitario¹⁶². La UCI es una de las áreas que presentan contaminación cruzada y por tanto está relacionada con mayor morbilidad debido a que se hospitalizan pacientes con alto compromiso inmunológico y con mayor número de factores de riesgo; ejemplo de ello es el estudio multicéntrico realizado por Blumberg & cols. en 13 UCI's durante 18 meses; en este estudio se observó que el 34 % de los pacientes adultos y el 30 % de los

pacientes pediátricos fueron colonizados por *Candida* spp., asimismo se aislaron de las manos del personal que atendió a los pacientes, el análisis epidemiológico con tipificaciones moleculares demostró la contaminación cruzada entre el personal y los pacientes²¹. Los pacientes incluidos en el presente trabajo tenían diversos factores de riesgo que favorecieron el desarrollo de la infección sanguínea por *Candida*, entre los de mayor relevancia se encuentra el uso de nutrición parenteral (12/12), presencia de catéter (12/12), tratamiento con antibióticos de amplio espectro (11/12) y cirugías recientes (5/12); es importante destacar que la presencia de dichos factores predisponentes fueron clave en establecimiento de la infección puesto que provocaron episodios de inmunosupresión en los pacientes. Además, el 58.3 % de los pacientes tuvo un hemocultivo positivo durante su estancia en la UCI; lo anterior orienta a que la infección pudo desarrollarse durante la estancia en ese servicio y probablemente la fuente de infección fue intrahospitalaria debido a que ninguno tenía como diagnóstico de base la candidemia; sino que fue una infección presentada en algunos de los días de hospitalización. Evidencia de lo anterior fue lo sucedido con la paciente de la muestra 06 – 15 quien permaneció hospitalizada desde los primeros días del mes de mayo, posteriormente durante los últimos días del mes de junio (24 – Jun – 2018) fue diagnosticada con candidosis hematológica y finalmente egresó el 27 – Jul – 2017.

Candida guilliermondii es una de las especies menos común como agente etiológico de la candidosis hematológica; sin embargo, en Latinoamérica ha tenido un aumento considerable donde representa hasta el 6.5 % de los casos de candidemia¹⁴². En México, de acuerdo con lo reportado por Reyes & cols., *C. guilliermondii* causó el 0.94 % de las candidosis hematológicas¹⁸⁴. *Candida guilliermondii* representó el 47.92 % de los aislamientos en la epidemiología local del presente estudio; porcentaje que está por encima de lo reportado en la literatura mundial, incluso considerando el aumento que se ha presentado en Latinoamérica; este inesperado aumento se puede atribuir a un brote de infección nosocomial.

Se considera brote de infección nosocomial a la ocurrencia de un mayor número de casos de un determinado tipo de infección, en cantidad superior a la esperada, para un determinado servicio u hospital y dentro de un periodo específico. Generalmente, están relacionados con la alteración o modificación de los mecanismos de control y/o normas y

procedimientos de cuidados de los pacientes. Para comprobar o descartar la existencia de un brote nosocomial, se deben comparar las tasas de morbilidad de la infección, tanto en el periodo pre epidémico como posepidémico¹³⁶. Los aislados de *C. guilliermondii* estudiados en el presente trabajo fueron obtenidos en un periodo de 55 días, en el tiempo previo a este periodo (Enero – Junio 2017) y durante el año 2016 esta especie no fue aislada de ningún espécimen clínico; asimismo, *C. guilliermondii* fue aislada en una ocasión de un espécimen distinto de sangre durante el tiempo transcurrido posterior al probable brote. De acuerdo con lo anterior y siguiendo con la definición de brote, los casos de candidosis hematogena por *Candida guilliermondii* aisladas en el presente estudio podrían considerarse como un brote de infección nosocomial.

La identificación adecuada de las diferentes especies de *Candida* aisladas a partir de las muestras clínicas es de suma importancia, con el fin de corroborar el diagnóstico clínico, obtener un diagnóstico micológico preciso e instaurar un tratamiento antifúngico adecuado⁶⁰. Sin embargo, la identificación de diversas especies de *Candida* en muchas ocasiones suele ser incorrecta por la similitud fenotípica y bioquímica entre algunas especies; tal es el caso de *C. guilliermondii*, la cual es indistinguible fenotípicamente de *C. famata*; además, sus perfiles bioquímicos son muy parecidos, por lo que su diferenciación por métodos tradicionales como API 20AUX® y Vitek® 2 suele ser imprecisa y poco confiable^{35, 139}. Sin embargo, diversos autores han descrito algunas características fenotípicas de *C. guilliermondii* para diferenciarla de otras especies. García & cols. describieron la morfología colonial de *C. guilliermondii* en CHROMagar Candida® como colonias de color rosa claro y superficie brillante, en contraste con *C. famata* que desarrolla colonias de la misma tonalidad, pero con superficie mate y con *C. parapsilosis* que exhibe colonias rosas claro de superficie mate y aspecto rugoso o liso⁷⁷. Otra de las características fenotípicas que se han descrito para la diferenciación de *C. guilliermondii* es la formación de pseudohifas; Pinoni & cols. propusieron un algoritmo para la identificación presuntiva de *C. guilliermondii* mediante características fenotípicas. De las colonias obtenidas de color rosado-púrpura en CHROMagar Candida® y a las 96 horas de incubación se debe observar agrupaciones de pseudohifas, lo anterior no se observó para *C. famata*¹⁷⁰. Otros autores han descrito la formación de pseudohifas en medios con bajos niveles de nutrientes como el agar harina de maíz adicionado con tween

80, a partir de las 72 horas de incubación a 25 °C^{29, 194}. En el caso de *C. parapsilosis* se ha descrito que posee la capacidad de desarrollar pseudohifas largas y abundantes en los medios antes descritos^{29, 137}.

Otra de las características que se han descrito para la diferenciación entre las especies de *Candida* es el crecimiento en presencia de cicloheximida. *Candida guilliermondii* tiene la capacidad de desarrollarse en presencia de este fármaco, mientras que *C. famata* presenta variabilidad, ya que puede ser sensible o resistente a la cicloheximida y *C. parapsilosis* es sensible¹³.

En el presente estudio todos los aislados de *C. guilliermondii* mostraron colonias de tonalidad lila en CHROMagar Candida® después de 48 horas de incubación, el cual correspondió al código 7652 UP en la paleta de colores Pantone®; en contraste con lo descrito en la literatura, *C. guilliermondii* durante las primeras 24 horas desarrolló colonias de color rosa claro que más tarde se tornaron de tonalidad lila-púrpura, la coloración de las colonias depende del tiempo de incubación. Sin embargo, es importante destacar que la coloración es algo subjetivo y depende de la experiencia y agudeza visual de cada observador y podría ser de mayor exactitud al compararlo con la paleta de colores Pantone®. Con respecto a los cuatro aislados de *C. parapsilosis* se obtuvieron dos variantes morfológicas, ambas presentaron colonias de color rosa pálido (9263 C) y superficie mate; sin embargo, dos aislados presentaron aspecto rugoso y dos aspecto liso, dichas características coincidieron con lo descrito en la literatura⁷⁷.

Otro hallazgo observado en todos los aislados de este estudio fue la formación de pseudohifas, en agar fécula de papa – zanahoria adicionado con tween 80 al 1%, desde las 24 horas de incubación; a diferencia de lo reportado por otros autores donde el cambio se produce de las 72 a 96 horas en *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis* desde las 48 horas en agar harina de maíz adicionado con tween 80 al 1 %^{29, 137, 170}. Esta diferencia se podría deber a la cantidad de nutrientes entre los medios de cultivo; el medio utilizado contiene alimento procesado de zanahoria con diversos azúcares; sin embargo, la proporción fue baja (2 %) y en ambiente anaerobio, lo cual estimuló posiblemente el crecimiento de las levaduras y formación de pseudohifas. En el caso de *C. parapsilosis* forma pseudohifas con dos morfologías diferentes, la forma arboriforme (pseudohifas en disposición vertical y ramificadas) y en disposición aracniforme (pseudohifas a partir de un cúmulo central y

ramificadas); a diferencia de *C. guilliermondii* las pseudohifas presentan una sola disposición con crecimiento vertical y ramificaciones cortas.

Aunque las pruebas fenotípicas son útiles para diferenciar entre las diversas especies, son laboriosas y tardadas por lo que su adaptación al trabajo diario de un laboratorio clínico intrahospitalario sería complicado. En los últimos años se ha recurrido a técnicas de biología molecular para la identificación de diversas especies de *Candida*, como lo realizado por Mohammadi & cols. quienes a través de la amplificación por PCR y posterior digestión de la región ITS1 – 5.8S – ITS2 con la enzima de restricción *MspI* obtuvieron patrones característicos de 19 levaduras de distintos géneros y especies¹²⁹. Estas técnicas son una herramienta de utilidad para la identificación de especies taxonómicamente cercanas, en el presente trabajo 20 aislados clínicos fueron identificados como *C. guilliermondii* y cuatro como *C. parapsilosis* utilizando los patrones descritos por Mohammadi & cols. Sin embargo, dicha técnica permite únicamente la identificación de la especie como complejo, por lo que dilucidar cuál de las tres especies que lo conforman está causando la patología requeriría de estudios mucho más complejos; ejemplo de ello es lo realizado por Desnos & cols. quienes a través de secuenciación de la región ITS1 – 5.8S – ITS2 lograron identificar las especies que integran los complejos de *C. guilliermondii* y *C. famata*⁵⁵, asimismo por el mismo método Caton & cols. identificaron las especies complejo *C. parapsilosis*³¹.

La importancia de identificar a *C. guilliermondii* radica en la diferencia en la resistencia que presenta a los antifúngicos. Savini & cols. en 2010 detectaron cepas de *C. guilliermondii* multirresistentes a los azoles y equinocandinas, quedando como opción terapéutica viable la administración de anfotericina B para el paciente con candidemia por esta especie¹⁹³. En el presente trabajo todos los aislados fueron sensibles para cinco de los seis antifúngicos evaluados a las 24 horas de incubación, de acuerdo a lo establecido por el CLSI para el caso del método de referencia y acorde con lo establecido por el fabricante para SENSITRE YeastOne®; sin embargo, para el caso específico de la caspofungina por ambos métodos a las 48 horas de incubación, todos los aislados presentaron valores de CMI correspondientes a resistencia ($\geq 16 \mu\text{g/mL}$) por ambos métodos, por lo que se podría decir que la caspofungina únicamente es un antifúngico con características fungistáticas y no fungicidas para esta especie, por lo que no se

consideró como la mejor opción terapéutica en los pacientes del presente estudio; además de tomar en cuenta las interacciones con otro medicamentos. El tratamiento antifúngico inadecuado es uno de los factores más relevantes en la mortalidad hospitalaria, la candidemia es uno de los tipos de infección con las tasas más altas de tratamiento inicial inapropiado, alcanzando valores de hasta el 70 % de fracasos^{23, 93}. Debido al aumento de las distintas especies de *Candida* y en el desarrollo de resistencia frente a los diferentes antifúngicos, el perfil de sensibilidad – resistencia es uno de los estudios de mayor relevancia que debe de realizarse a los aislados de *Candida* spp. obtenidos de los pacientes con diagnóstico de candidemia, con la finalidad de iniciar la terapia antifúngica temprana y oportuna, lo cual favorecerá la evolución del paciente^{79, 118, 133}.

Las pruebas de sensibilidad antifúngica para levaduras representaron un gran problema durante las últimas décadas del siglo XX, debido a que los métodos existentes tenían baja reproducibilidad y eran muy poco comparables⁷⁴. En 1997, el CLSI publicó un método estandarizado (M27 – A) para determinar el perfil de sensibilidad antifúngica de *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*; este documento se ha ido actualizando en diferentes versiones, el más reciente es el documento M27 – A3 publicado en 2008 y el suplemento M27 – S4 en el 2012^{10, 41, 182}.

En general, los métodos de referencia (CLSI) son bastante laboriosos debido a la cantidad de trabajo necesario para preparar las diluciones de los antifúngicos y las placas de microdilución, su adaptación en laboratorios clínicos ha representado un problema de importancia debido al exceso de trabajo diario¹⁸⁷. Atendiendo a lo anterior, diversas empresas se han dado a la tarea de desarrollar metodologías que faciliten la determinación del perfil de sensibilidad a antifúngicos, dentro de los cuales SENSITITRE YeastOne® ha destacado por su fácil manejo y sencillas lecturas de CMI¹¹⁰.

Lo ideal sería que los distintos métodos para la determinación del perfil de sensibilidad de antifúngicos fueran equivalentes para que se puedan usar de manera indistinta y que los resultados sean confiables. Diversos autores han realizados estudios de comparación entre el método de referencia M27 – A3 y SENSITITRE YeastOne® con porcentajes de concordancia desde el 70 % hasta el 99 % para algunos antifúngicos y sobre diversas especies incluyendo *C. guilliermondii*^{18, 63}. El presente estudio demostró

buena concordancia para cinco de los seis antifúngicos evaluados con una concordancia global del 81.67 %. La concordancia entre los métodos se vio afectada únicamente por el fluconazol, dicho antifúngico presentó nula concordancia entre los métodos. La lejanía entre los valores de CMI obtenidos podría explicarse al analizar la integridad del fármaco, puesto que aún incluso con las cepas control los valores de CMI obtenidos para fluconazol fueron altos, aunque dentro de parámetros de sensibilidad. Si el fármaco estaba parcialmente degradado las concentraciones de cada pozo serían menores, por lo que se observó un aumento en los valores de CMI. Además, es importante destacar que todas las placas de microdilución empleadas en el estudio fueron del mismo lote, por lo que el resultado fue consistente en todos los aislados.

Aunque la concordancia entre los métodos fue buena con la mayoría de los antifúngicos evaluados se deben realizar más estudios de comparación entre el método de referencia y SENSITITRE YeastOne®, sería de relevancia realizar repeticiones de la prueba con distintos lotes de SENSITITRE YeastOne® con el fin de descartar cualquier error de manufactura o integridad del fármaco.

Globalmente *C. guilliermondii* es causante de aproximadamente 1029 casos de candidosis hematógena anualmente¹⁶⁴; por lo que un estudio de importancia epidemiológica en materia de resistencia a antifúngicos necesitaría al menos 280 aislados; asimismo aumentar el número de muestras facilitaría el análisis estadístico por pruebas más robustas.

Para reducir la mortalidad y la prolongación hospitalaria de pacientes con candidosis hematógena es fundamental reducir y estabilizar los factores de riesgo de cada paciente, la correcta identificación de la especie causante de la infección, así como la determinación del perfil de sensibilidad por métodos rápidos, sencillos y confiables que se puedan utilizar en los laboratorios clínicos hospitalarios. La comparación de los métodos comerciales, que sean más sencillos y rápidos, permitirá el uso cotidiano en los laboratorios clínicos de hospitales generales con la finalidad de detectar aislados fúngicos resistentes y que sea un apoyo confiable para el médico clínico y evitar el retraso en la administración del antifúngico adecuado.

VIII. Conclusiones

La principal especie aislada de pacientes con diagnóstico de candidosis hematológica en el Instituto Nacional de Pediatría en el 2017 fue *C. guilliermondii* seguida de *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

Veinte aislados se identificaron como *Candida guilliermondii* y cuatro como *Candida parapsilosis* por métodos fenotípicos, bioquímicos y moleculares.

Todos los aislados fueron sensibles a cinco de los antifúngicos evaluados por ambos métodos de microdilución, mientras que itraconazol fue sensible dosis dependiente en el 54.17 % y el 4.17 % por el método de referencia M27 – A3 y por SENSITITRE YeastOne®, respectivamente.

Los antifúngicos que mostraron mayor actividad sobre todos los aislados clínicos fueron voriconazol y posaconazol con valores de 0.03 µl/mL por el método de referencia M27 – A3 y 0.06 µl/mL por SENSITITRE YeastOne®.

La concordancia entre los métodos fue del 81.67 % con buena concordancia para todos los antifúngicos con excepción de fluconazol cuya concordancia entre los métodos fue de 0 %.

El antifúngico con la mejor concordancia entre ambos métodos de microdilución en caldo fue anfotericina B, quien presentó la mejor réplica de valores de CMI.

IX. Abreviaturas

| | |
|-----------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADS | Agar dextrosa Sabouraud |
| ADS – CC | Agar dextrosa Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol |
| ALS | Proteína de secuencia tipo aglutinina |
| AMB | Anfotericina B |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ATB | Antibióticos de amplio espectro |
| BiGGY | <i>Bismuth Glucose Glycine Yeast Agar</i> |
| CHS | Hidrofobicidad relativa de la superficie celular |
| CLSI | Instituto de Estandarización de Laboratorios Clínicos |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| CSP | Caspofungina |
| CVC | Catéter venoso central |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| ELISA | <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| EUA | Estados Unidos de América |
| EUCAST | Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana |
| F | Femenino |
| FLZ | Fluconazol |
| IGS | Espacios intergenéticos |
| ITS | Espacios intertranscripcionales |
| ITZ | Itraconazol |
| M | Masculino |
| MALDI-TOF | <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight</i> |
| MOPS | Ácido morfolino propano sulfónico |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |

| | |
|--------|--|
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PSZ | Posaconazol |
| R | Resistente |
| RN | Recién nacido |
| RFLP | Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción |
| S | Sensible |
| SAPs | Aspartil proteinasas secretadas |
| S – DD | Sensible – Dosis dependiente |
| SIDA | Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida |
| SSI | Solución salina isotónica |
| UCI | Unidad de cuidados intensivos |
| UFC | Unidad formadora de colonia |
| VIH | Virus de Inmunodeficiencia Humana |
| VRZ | Voriconazol |

X. Anexos

X.1 Medios de cultivo

Agar dextrosa Sabouraud (ADS)

Reactivos

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Agua destilada | 1000 mL |
| Digerido pancreático de caseína | 5.0 g |
| Digerido péptico de tejido animal | 5.0 g |
| Dextrosa | 40.0 g |
| Agar | 15.0 g |

Procedimiento

1. Suspender los componentes del medio ADS en 1000 mL de agua destilada calentándolo en placa térmica hasta ebullición y agitando constantemente el tiempo necesario para completar la disolución de los reactivos.
2. Esterilizar el medio ADS en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y 1.1 kg/cm² de presión, es recomendable emplear cinta testigo para verificar las condiciones de esterilización. Evitar el calentamiento excesivo ya que puede deteriorar los ingredientes.
3. Distribuir el medio en cajas de Petri estériles, para una placa normal de 90 a 100 mm es apropiado un volumen de 19 a 21 mL; dejar solidificar el medio.
4. Almacenar a una temperatura entre 2 y 8 °C.

Agar dextrosa Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (ADS – CC)

Reactivos

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Agua destilada | 1000 mL |
| Digerido pancreático de caseína | 5.0 g |
| Digerido péptico de tejido animal | 5.0 g |
| Dextrosa | 40.0 g |
| Agar | 15.0 g |
| Cicloheximida | 0.5 g |
| Cloranfenicol | 0.05 g |

Procedimiento

1. Suspender los componentes del medio ADS - CC en 1000 mL de agua destilada calentándolo en placa térmica o baño María hasta ebullición y agitando constantemente el tiempo necesario para completar la dilución de los reactivos.
2. Esterilizar el medio ADS - CC en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y 1.1 kg/cm² de presión, es recomendable emplear cinta testigo para verificar las condiciones de esterilización. Evitar el calentamiento excesivo ya que puede deteriorar los ingredientes.
3. Distribuir el medio en cajas de Petri estériles, para una placa normal de 90 a 100 mm es apropiado un volumen de 19 a 21 mL; dejar solidificar el medio.
4. Almacenar a una temperatura entre 2 y 8 °C.

CHROMagar Candida®

Reactivos

| | |
|------------------|---------|
| Agua destilada | 1000 mL |
| Cromopeptona | 10.0 g |
| Mezcla cromógena | 2.0 g |
| Glucosa | 20.0 g |
| Agar | 15.0 g |
| Cloranfenicol | 0.5 g |

Procedimiento

1. Suspender los componentes del medio CHROMagar Candida® en 1000 mL de agua destilada calentándolo en placa térmica hasta ebullición y agitando constantemente con movimientos rotatorios el tiempo necesario para completar la fusión de los granos de agar.
2. Esterilizar el medio CHROMagar Candida® por ebullición, hasta obtener la formación de grandes burbujas que remplazan a las pequeñas, durante dos minutos.
3. Distribuir el medio en cajas de Petri estériles, para una placa normal de 90 a 100 mm es apropiado un volumen de 19 a 21 mL; dejar solidificar el medio.
4. Almacenar a una temperatura entre 2 y 8 °C.

Agar fécula de papa – zanahoria con tween 80 al 1 %

Reactivos

| | |
|----------------|---------|
| Agua destilada | 1000 mL |
| Fécula de maíz | 10.0 g |
| Zanahoria | 10.0 g |
| Tween 80 | 10 mL |
| Agar | 15.0 g |

Procedimiento

1. Suspender los componentes del medio Agar fécula de papa – zanahoria con tween 80 al 1 % en 1000 mL de agua destilada con excepción del tween 80 y el agar, se calienta en placa térmica hasta ebullición y agitando constantemente durante 10 minutos para completar la disolución de los reactivos; posteriormente, se filtra y se añade el tween 80 y el agar calentándolo nuevamente hasta completar la fusión de los granos de agar.
2. Esterilizar el medio en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y 1.1 kg/cm² de presión, es recomendable emplear cinta testigo para verificar las condiciones de esterilización.
3. Distribuir el medio en cajas de Petri estériles, para una placa normal de 90 a 100 mm es apropiado un volumen de 19 a 21 mL; dejar solidificar el medio.
4. Almacenar a una temperatura entre 2 y 8 °C.

Caldo RPMI 1640

Reactivos

| | |
|-------------------|---------|
| Agua destilada | 1000 mL |
| Amortiguador MOPS | 34.5 g |
| RPMI 1640 | 10.4 g |

Procedimiento

1. Suspender los componentes del Caldo RPMI 1640 en 1000 mL de agua destilada, se mantiene en agitación constantemente el tiempo necesario para completar la dilución de los reactivos; posteriormente, se ajusta el pH del medio a 7 ± 0.1 con hidróxido de sodio (NaOH) 1M.
2. Esterilizar el caldo por filtración con unidades de filtro de 0.2 μm .
3. Almacenar a una temperatura de 4 °C.

XI. Bibliografía

1. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. Clin Infect Dis. 1997;24(6):1122–8.
2. Alby K, Bennett RJ. Sexual reproduction in the *Candida* clade: cryptic cycles, diverse mechanisms, and alternative functions. Cell Mol Life Sci. 2010;67(19):3275–85.
3. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson KE, Anstrom KJ, Perfect JR, Reller B. Comparative evaluation of Etest and Sensititre YeastOne panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. J Clin Microbiol. 2007;45(3):698–706.
4. Amaral-Lopes S, Moura A. Neonatal fungal sepsis by *Candida krusei*: A report of three cases and a literature review. Med Mycol Case Rep. 2012;1(1):24–6.
5. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. 2^a ed. United States of America: Churchill Livingstone Elsevier; 2009. pp. 1-31, 161-221.
6. Angel-Moreno A, Boronat M, Bolaños M, Carrillo A, González S, Pérez Arellano JL. *Candida glabrata* fungemia cured by antibiotic-lock therapy: Case report and short review. J Infect. 2005;51(3):e85–7.
7. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of Bacteria using Mass Spectrometry. Anal Chem. 1975;47(2):219–25.
8. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. Eur J Intern Med. 2016;34:21–8.
9. Arenas R. Micología médica ilustrada. 5^a ed. México: McGraw-Hill Education; 2014. pp. 240-247.
10. Arian S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. Med Mycol. 2007;45(7):569–87.
11. Aubertine CL, Rivera M, Rohan SM, Larone DH. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar Candida as a source medium with the new card. J Clin Microbiol. 2006;44(1):227–8.

12. Baran Jr. J, Muckatira B, Khatib R. Candidemia before and during the fluconazole era: prevalence, type of species and approach to treatment in a tertiary care community hospital. *ScandJ Infect Dis.* 2001;33(2):137–9.
13. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. *Yeast: Characteristics and identification.* 3^a ed. United Kingdom: Cambridge University Press; 2000. pp. 336-337, 523.
14. Bassetti M, Merelli M, Righi E, Diaz-Martin A, Rosello EM, Luzzati R, *et al.* Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of Candidemia across five sites in Italy and Spain. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4167–72.
15. Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using albicans ID and CHROMagar Candida plates. *J Clin Microbiol.* 1996;34(2):454-6.
16. Ben-Ami R, Olshtain-Pops K, Krieger M, Oren I, Bishara J, Dan M, *et al.* Antibiotic exposure as a risk factor for fluconazole-resistant *Candida* bloodstream infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2518–23.
17. Bernal S, Aller AI, Chávez M, Valverde A, Serrano C, Gutiérrez MJ, *et al.* Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric microdilution panel and the NCCLS broth microdilution method for antifungal susceptibility testing against *Candida* species. *Chemotherapy.* 2002;48(1):21–5.
18. Bertout S, Dunyach C, Drakulovski P, Reynes J, Mallié M. Comparison of the Sensititre YeastOne® dilution method with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 microbroth dilution reference method for determining MIC of eight antifungal agents on 102 yeast strains. *Pathol Biol.* 2011;59(1):48–51.
19. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, *et al.* Population-based analysis of invasive fungal infections. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(7):1149–55.
20. Blanco JL, Garcia ME. Immune response to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;125(1–2):47–70.
21. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, *et al.* Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. *The National Epidemiology Of Mycosis Survey Clin Infect Dis.* 2001;33(2):177–86.

22. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. 4ª ed. México: McGraw-Hill Education; 2012. pp. 321-347.

23. Bouza E, Sousa D, Muñoz P, Rodríguez-Créixems M, Fron C, Lechuz JG. Bloodstream infections: a trial of the impact of different methods of reporting positive blood culture results. *Clin Infect Dis*. 2004;39(8):1161–9.

24. Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(2):183-8.

25. Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex?. *Annu Rev Entomol*. 1995;40: 511–34.

26. Buesching WJ, Kurek K, Roberts GD. Evaluation of the modified API 20C system for identification of clinically important yeasts. *J Clin Microbiol*. 1979;9(5):565–9.

27. Bump CM, Kunz LJ. Routine identification of yeasts with the aid of molybdate-agar medium. *Appl Microbiol*. 1968;16(10):1503–6.

28. Calderone, RA, Corneliues JC. *Candida* and candidosis. 2ª ed. United States of America: American Society for Microbiology Press; 2012. pp. 23-30.

29. Campbell CK, Johnson EM, Warnock DW. Identification of pathogenic fungi. 2ª ed. United Kingdom: Wiley – Blackwell; 2013. pp. 284, 287.

30. Cantón E, Martín E, Espinel A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo MC. *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*. 2ª ed. España: Rev Iberoam Micol; 2007. pp.181-204.

31. 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.

32. Cárdenes CD, Carrillo AJ, Arias A, Rodríguez-Alvarez C, Torres-Lana A, Sierra A, *et al*. Comparison of Albicans ID2 agar plate with the germ tube for presumptive identification of *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;42(3):181–5.

33. Cárdenes CD, Carrillo-Muñoz AJ, Arias A, Rodríguez-Alvarez C, Torres-Lana A, Sierra A, *et al.* Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. J Microbiol Methods. 2004;59(2):293–7.

34. Carrillo-Muñoz AJ, Abarca L, Quindós G. Métodos colorimétricos para la determinación de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. Rev Iberoam. 2001;18(4):150–5.

35. Castanheira M, Woosley LN, Diekema DJ, Jones RN, Pfaller MA. *Candida guilliermondii* and other species of *Candida* misidentified as *Candida famata*: assessment by vitek 2, DNA sequencing analysis, and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in two global antifungal surveillance programs. J Clin Microbiol. 2013;51(1):117–24.

36. Castellani A. Observations on the fungi found in tropical bronchomycosis. Lancet. 1912;179(4610):13-15.

37. Charsizadeh A, Mirhendi H, Nikmanesh B, Eshaghi H, Makimura K. Microbial epidemiology of candidaemia in neonatal and paediatric intensive care units at the Children's Medical Center, Tehran. Mycoses. 2018;61(1):22–9.

38. Chi HW, Yang YS, Shang ST, Chen KH, Yeh KM, Chang FY, *et al.* *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: the comparison of risk factors and outcome. J Microbiol Immunol Infect. 2011;44(5):369–75.

39. Chen CY, Huang SY, Tang JL, Tsay W, Yao M, Ko BS, *et al.* Clinical features of patients with infections caused by *Candida guilliermondii* and *Candida fermentati* and antifungal susceptibility of the isolates at a medical centre in Taiwan, 2001-10. J Antimicrob Chemother. 2013;68(11):2632–5.

40. Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Comparison of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility test of yeast species. J Clin Microbiol. 2002;40(10):3841–4.

41. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standart. 3^a ed. United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

42. Colombo AL, Guimarães T, Sukienik T, Pasqualotto AC, Andreotti R, Queiroz-Telles F, *et al.* Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive Care Med.* 2014;40(10):1489–98.
43. 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.
44. Costa SO, Branco CDeL. Evaluation of a molybdenum culture medium as selective and differential for yeasts. *J Pathol Bacteriol* 1964; 87: 428-31.
45. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284(5418):1318–22.
46. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(2):380–407.
47. Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado E, Warnock DW, *et al.* Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(11):3644–7.
48. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ, *et al.* Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for *in vitro* detection on antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1782–6.
49. Cuétara MS, Alhambra A, Del Palacio A. Diagnóstico microbiológico tradicional de la candidiasis invasora en el enfermo crítico no neutropénico. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23(1):4-7.
50. Dabiri S, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species isolated from clinical specimens. *J Mycol Med.* 2018. pii: S1156-5233(17)30368-2. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.04.009.

51. Davey KG, Holmes AD, Johnson EM, Warnock DW, Holmes ANND, Szekely A. Comparative evaluation of FUNGITEST and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 1998;36(4):926–30.
52. De la Torre-Saldaña VA, Martínez Velázquez M, Reséndiz Sánchez J. Factores de riesgo y epidemiología de la candidemia en el Hospital Juárez de México. Med Int Mex. 2014;30(2):121–32.
53. Del-Cura González I, García-de-Blas González F, Cuesta TS, Martín Fernández J, Del-Alamo Rodríguez JM, Escriva Ferrairo RA, *et al.* Patient preferences and treatment safety for uncomplicated vulvovaginal candidiasis in primary health care. BMC Public Health. 2011;11:63. doi: 10.1186/1471-2458-11-63.
54. Denning DW. Echinocandins: a new class of antifungal. J Antimicrob Chemother. 2002;49(6):889–91.
55. Desnos-Ollivier M, Ragon M, Robert V, Raoux D, Gantier JC, Dromer F. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). J Clin Microbiol. 2008;46(10):3237–42.
56. Diasio RB, Bennett JE, Myers CE. Mode of action of 5-fluorocytosine. Biochem Pharmacol. 1978;27(5):703-7.
57. Digby J, Kalbfleisch J, Glenn A, Larsen A, Browder W, Williams D. Serum glucan levels are not specific for presence of antifungal infections in intensive care unit patients. Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10(5):882–5.
58. Dos Santos AL, Soares RM. *Candida guilliermondii* isolated from HIV-infected human secretes a 50 kDa serine proteinase that cleaves a broad spectrum of proteinaceous substrates. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;43(1):13–20.
59. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003;11(1):30–6.
60. Duarte A, Márquez A, Araujo C, Pérez C. Modalidades de la prueba del tubo germinal. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2009; 29(1):66-68.
61. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patient. Lancet Infect Dis. 2003;3(11):685–702.

62. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. J. Antimicrob. Chemother. 2002;49 Suppl 1:7-10.

63. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Holliday N, Killian SB. Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. J Clin Microbiol. 2004;42(2):718–21.

64. Espinosa IM, Ibarra MG, Torres-Guerrero HK. Identificación molecular de *Candida lusitanae* en infección de tracto respiratorio inferior. Rev Argent Microbiol. 2014;46(4):307–10.

65. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Documento 7.1 Método de dilución en caldo para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de antifúngicos para levaduras. Version 7.1. Switzerland: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2008.

66. Feldmann H. Yeast: Molecular and Cell Biology. 2^a ed. United States of America: Wiley – Blackwell; 2011. pp. 5-24.

67. Figueiredo-Carvalho MH, Barbedo LS, Oliveira MM, Brito-Santos F, Almeida-Paes R, Zancopé-Oliveira RM. Comparison of commercial methods and the CLSI broth microdilution to determine the antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* complex bloodstream isolates from three health institutions in Rio de Janeiro, Brazil. Mycopathologia. 2014;178(1–2):27–35.

68. Fisher MA, Shen SH, Haddad J, Tarry WF. Comparison of in vivo activity of fluconazole with that of amphotericin B against *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33(9):1443–6.

69. Freydière M, Buchaille L, Gille Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of *Candida* species in clinical specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997;16(6):464–7.

70. Freydiere AM, Buchaille L, Guinet R, Gille Y. Evaluation of latex reagents for rapid identification of *Candida albicans* and *C. krusei* colonies. J Clin Microbiol. 1997;35(4):877–80.

71. Fricker-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne MA, Mazoyer MA, Monget D, Lardy B, *et al.* Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol.* 1996;34(7):1846-8.
72. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(4):499–511.
73. Fridkin SK. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin Infect Dis.* 2005;41(10):1455–60.
74. Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bartizal KF, Bartlett MS, *et al.* Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(1):39–45.
75. Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis.* 1990;12(2):308-29.
76. Ganis P, Avitabile G, Mechlinski W, Schaffner CP. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative. *J Am Chem Soc.* 1971;93(18):4560–4.
77. García-Martos P, García-Agudo R, Hernández-Molina JM, Marín P, Tallero E, Mira J. Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*. *Rev Iberoam Micol.* 1998;15(3):131–5.
78. 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.
79. Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, *et al.* Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis.* 2006;43(1):25–31.
80. Georgopapadakou NH, Walsh TJ. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science.* 1994;264(5157):371–3.
81. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(4):501–17.

82. Godoy P, Almeida LP, Lopes Colombo A. Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogénico Albicans ID. Rev Iberoam Micol. 2001;18(4):197–9.
83. Golan Y, Wolf MP, Pauker SG, Wong JB, Hadley S. Empirical anti-*Candida* therapy among selected patients in the intensive care unit: a cost-effectiveness analysis. Ann Intern Med. 2005;143(12):857-69.
84. Goldschmidt MC, Fung DY, Grant R, White J, Brown T. New aniline blue dye medium for rapid identification and isolation of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1991;29(6):1095–9.
85. Gregorí-Valdés BS. Estructura y actividad de los antifúngicos. Rev Cubana Farm. 2005;39(2).
86. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. Clin Microbiol Infect. 2014;20(Suppl 6):5–10.
87. Hata DJ, Hall L, Fothergill AW, Larone DH, Wengenack NL. Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. J Clin Microbiol. 2007;45(4):1087–92.
88. Hector RF. Compounds active against cell walls of medically important fungi. Clin Microbiol Rev. 1993;6(1):1–21.
89. Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, Pereira-Góngora JR, Villamil-Urzaiz JL. Frecuencia de portadores de *C. albicans* en un grupo de niños de una comunidad rural del estado de Yucatán. Rev Odontol Latinoam 2008;0(1):1–4.
90. Hoyer LL. The *ALS* gene family of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001;9(4):176–80.
91. Hsu SF, Burnette RR. The effect of amphotericin-B on the K-channel activity of MDCK cells. Biochim Biophys Acta. 1993;1152(1):189–91.
92. Hube B, Rüchel R, Monod M, Sanglard D, Odds FC. Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. Adv Exp Med Biol. 1998;436:339-44.
93. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. Chest. 2000;118(1):146–55.

94. Ilkit M, Hilmioglu S, Tasbakan M, Aydemir S. Evaluation of Albicans ID2 and Biggy agar for the isolation and direct identification of vaginal yeast isolates. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt6):762–5.
95. Juárez-Reyes K, Araiza J, Bonifaz A. Formación de clamidoconidios de *Candida albicans* y *C. dubliniensis* en diferentes medios líquidos y condiciones de incubación. *Revista Mexicana de Micología.* 2007;(25):27–31.
96. Kim SH, Shin JH, Mok JH, Kim SY, Song SA, Kim HR, *et al.* Misidentification of *Candida guilliermondii* as *C. famata* among strains isolated from blood cultures by the VITEK 2 system. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 250408. doi: 10.1155/2014/250408.
97. Kleinegger CL, Lockhart SR, Vargas K, Soll DR. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2246–54.
98. Kliegman R, Stanton B, St. Geme J. Tratado de pediatría. 20^a ed. España: Elsevier; 2016. pp.1051-1055.
99. Klingspor L, Tortorano AM, Peman J, Willinger B, Hamal P, Sendid B, *et al.* Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(1):87. e10.doi: 10.1016/j.cmi.2014.08.011.
100. Koehler AP, Chu KC, Houang ET, Cheng AF. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1999;37(2):422–6.
101. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(2):255–67.
102. Kurtzman CP. *Meyerozyma* Kurtzman & M. Suzuki (2010). En: Kurtzman CP. *The Yeasts.* 5^a ed. United States of America: Elsevier; 2011. pp. 621-624.
103. Langer R, Weissleder R. Nanotechnology. *JAMA.* 2015;313(2):135–6.
104. Lastauskienė E, Čepulytė J, Girkontaitė I, Zinkevičienė A. Phenotypic switching of *Candida guilliermondii* is associated with pseudohyphae formation and antifungal resistance. *Mycopathologia.* 2015;179(3–4):205–11.
105. Leroy O, Bailly S, Gangneux JP, Mira JP, Devos P, Dupont H, *et al.* Systemic antifungal therapy for proven or suspected invasive candidiasis: the AmarCAND 2 study. *Ann Intensive Care.* 2016;6(1):2. doi: 10.1186/s13613-015-0103-7.

106. Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, *et al.* Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med.* 2009;37(5):1612–8.

107. Li SY, Yang YL, Chen KW, Cheng HH, Chiou CS, Wang TH, *et al.* Molecular epidemiology of long-term colonization of *Candida albicans* strains from HIV-infected patients. *Epidemiol Infect.* 2006;134(2):265–9.

108. Linares MJ, Solis F. Identificación de levaduras. En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo MC. *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica.* 2ª ed. España: Rev Iberoam Micol; 2007. pp. 102-122.

109. Lobaina-Rodríguez T, Zhurbenko R, Rodríguez-Martínez C, Zayas-Ruiz Y, Rodríguez-Rodríguez A. Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método auxonograma modificado. *Rev Cubana Med Trop.* 2010;62(1):48–57.

110. Lombardi G, Farina C, Andreoni S, Fazii P, Faggi E, Pini G, *et al.* Comparative evaluation of Sensititre YeastOne vs. the NCCLS M27A protocol and E-test for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Mycoses.* 2004;47(9–10):397–401.

111. López C, Giro L, Ramos L, Ramadán S, Bulacio L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Rev Argent Microbiol.* 2005;37(1):16–21.

112. López-Martínez R, Bazán-Mora E, Méndez-Tovar LJ. Intradermorreacción con candidina en niños hospitalizados. *Rev Latinoamer Patol Clin Med Lab.* 2016;63(1):19–23.

113. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M, *et al.* Worrying trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002–2010). *Intensive Care Med.* 2014;40(9):1303-12.

114. Lyon JP, Moraes KC, Moreira LM, Aimbire F, de Resende MA. *Candida albicans*: genotyping methods and clade related phenotypic characteristics. *Braz J Microbiol.* 2010;41(4):841-9.

115. Mackenzie DW. Serum tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Pathol.* 1962;15(6):563–5.

116. Magadia RR, Weinstein MP. Laboratory diagnosis of bacteremia and fungemia. *Infect Dis Clin North Am.* 2001;15(4):1009-24.
117. Manafi M, Willinger B. Rapid identification of *Candida albicans* by fluoroplate candida agar. *J Microbiol Methods.* 1991;14:103-107.
118. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gac Med Mex.* 2008;144(1):23-6.
119. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, *et al.* Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991–2000. *Clin Infect Dis.* 2004;38(3):311–20.
120. Marcos-Zambrano LJ, Puig-Asensio M, Pérez-García F, Escribano P, Sánchez-Carrillo C, Zaragoza O, Padilla B, *et al.* *Candida guilliermondii* Complex Is Characterized by High Antifungal Resistance but Low Mortality in 22 Cases of Candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(7).
121. Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2009;47(9):2912–7.
122. Martin, A., G. Kobayashi. Yeast infection: Candidiasis, versicolor pytiriasis. En: Fitzpatrick T, Freedberg I, Eisen A, Wolff K, Austen K. *Dermatology in general medicine* 5^a ed. United States of America: McGraw-Hill; 1999. pp.2498-2508.
123. McGinnis MR. *Laboratory Handbook of Medical Mycology.* 1^a ed. United States of America: Academic Press; 1980. pp. 350-357.
124. Méan M, Marchetti O, Calandra T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care.* 2008;12(1):204. doi: 10.1186/cc6212.
125. Merz WG, Roderick JH. *Medical Mycology.* 10^a ed. United Kingdom: Hodder Arnold; 2005. pp. 49-55.
126. Mesa LM, Arcaya N, Cañas O, Machado Y, Calvo B. Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. *Rev Iberoam Micol.* 2004;21(3):135–8.

127. Metin DY, Hilmioglu-Polat S, Samlioglu P, Doganay-Ofllazoglu B, Inci R, Tumbay E. Evaluation of antifungal susceptibility testing with microdilution and Etest methods of *Candida* blood isolates. *Mycopathologia*. 2011;172(3):187–99.
128. Mishra R, Kelly P, Toolsie O, Ayyadurai P, Adrish M. Uncommon cause of fungemia in a patient with renal cell cancer: A case report of *Candida lusitanae* Fungemia. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(45):e8510. doi: 10.1097/MD.00000000000008510.
129. Mohammadi R, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Ghahri M, Shidfar MR, Jalalizand N, *et al.* Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients. *Med Mycol*. 2013;51(6):657–63.
130. Mohandas V, Ballal M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. *J Glob Infect Dis*. 2011;3(1):4-8.
131. Mohd-Tap R, Lim TC, Kamarudin NA, Ginsapu SJ, Abd-Razak MF, Ahmad N, *et al.* A Fatal Case of *Candida auris* and *Candida tropicalis* Candidemia in Neutropenic Patient. *Mycopathologia*. 2018;183(3):559-64.
132. Montagna MT, Lovero G, Borghi E, Amato G, Andreoni S, Campion L, *et al.* Candidemia in intensive care unit: a nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of the European literature from 2000 through 2013. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(5):661-74.
133. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained : a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(9):3640–5.
134. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental and physiological conditions. *Microbiology*. 2003;149(Pt1):261-7.
135. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, *et al.* Manual of clinical microbiology. 8^a ed. United States of America: ASM Press; 2003. pp. 945-956.
136. Navarrete SN, Mejía AJM, Rivera GB, Rangel FMS. ¿Cómo estudiar brotes de infección nosocomial? *Enf Infecc Microbiol*. 2003;23(1):17–22.

137. Németh T, Tóth A, Szenzenstein J, Horváth P, Nosanchuk JD, Grózer Z, *et al.* Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. PLoS One. 2013;8(7):e68704. doi: 10.1371/journal.pone.0068704.
138. Nickerson WJ. Reduction of inorganic substances by yeasts. I. Extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. J Infect Dis. 1953;93(1):43–56.
139. Nishikawa A, Tomomatsu H, Sugita T, Ikeda R, Shinoda T. Taxonomic position of clinical isolates of *Candida famata*. J Med Vet Mycol. 1996;34(6):411-9.
140. Nishikawa A, Sugita T, Shinoda T. Differentiation between *Debaryomyces hansenii/Candida famata* complex and *Candida guilliermondii* by polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol. 1997;19(2):125-9.
141. Nucci M, Thompson-Moya L, Guzman-Blanco M, Tiraboschi IN, Cortes JA, Echevarría J, *et al.* Recomendaciones para el manejo de la candidemia en adultos en América Latina. Rev Iberoam Micol. 2013;30(3):179–88.
142. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0059373.
143. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur J Biochem. 2000;267(17):5421–6.
144. O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo J, Vilgalys R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. Appl Environ Microbiol. 2005;71(9):5544–50.
145. Ochiuzzi ME, Cataldi S, Guelfand L, Maldonado I, Arechavala A. Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. Rev Argent Microbiol. 2014;46(2):107–10.
146. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol. 1994;32(8):1923–9.
147. Orbera-Ratón T. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev Iberoam Micol. 2009;21(1):15-9.

148. Ortiz B, Pérez-Alemán E, Galo C, Fontecha G. Molecular identification of *Candida* species from urinary infections in Honduras. *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(2):73–7.
149. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:49–79.
150. Pantone®. Find a Pantone Color. Carlstadt, NJ. [Internet]. [Consultado 1 Sep 2018]. Disponible en: <https://www.pantone.com/color-finder>
151. Papon N, Savini V, Lanoue A, Simkin AJ, Crèche J, Giglioli-Guivarc'h N, *et al.* *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Curr Genet.* 2013;59(3):73–90.
152. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, *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.
153. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, *et al.* Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2015;62(4):e1–50.
154. Pasqualotto AC, Antunes AG, Severo LC. *Candida guilliermondii* as the aetiology of candidosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006;48(3):123–7.
155. Pasqualotto AC, Zimmerman RA, Alves HS, Aquino VR, Branco D, Wiltgen D, *et al.* Take control over your fluconazole prescriptions: the growing importance of *Candida glabrata* as an agent of candidemia in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(9):898-9.
156. Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(1):86–124.
157. Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 2007;45(4):321–46.
158. Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis.* 1996;22(Suppl 2):S89-94.

159. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J Clin Microbiol. 1996;34(1):58–61.

160. Pfaller MA, Arikan S, Lozano-Chiu M, Chen Y, Coffman S, Messer SA, *et al.* Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol. 1998;36(9):2609–12.

161. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Plavan H, *et al.* Multisite reproducibility of MIC results by the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal susceptibility panel. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998;31(4):543–7.

162. Pfaller MA, Messer SA, Houston A, Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, *et al.* National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998;31(1):289–96.

163. Pfaller MA, Diekema DJ, International Fungal Surveillance Participant Group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. Clin Microbiol Infect. 2004;10(1):11–23.

164. Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC, *et al.* *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. J Clin Microbiol. 2006;44(10):3551–6.

165. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. J Clin Microbiol. 2006;44(3):819-26.

166. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D, CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. 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.

167. Pfaller MA, Chaturvedi V, Diekema DJ, Ghannoum MA, Holliday NM, Killian SB, *et al.* Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI

microdilution for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(4):365–8.

168. Pfaller MA, Wolk DM, Lowery TJ. T2MR and T2Candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future Microbiol.* 2016;11(1):103–17.

169. Pickering JW, Sant HW, Bowles CP, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):5957–62.

170. Pinoni M V., Castán V, Maegli MI, Lorenzo J, Frizzera F, Jewtuchowicz V, *et al.* Características fenotípicas útiles para la identificación presuntiva de *Candida guilliermondii*. *Rev Argent Microbiol.* 2007;39(2):81–3.

171. Pinto PM, Resende MA, Koga-Ito CY, Tendler M. Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. isolates using random amplified polymorphic DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(2):147–52.

172. Polak A, Grenson M. Evidence for a Common Transport System for Cytosine, Adenine and Hypoxanthine in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eur J Biochem.* 1973;32(2):276-82.

173. Polak A, Scholer HJ. Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy.* 1975;21(3-4):113-30.

174. Polak A. Combination therapy of experimental candidiasis, cryptococcosis, aspergillosis wangiellosis in mice. *Chemotherapy.* 1987;33(5):381-95.

175. Portela MB, Lima de Amorim E, Santos AM, Alexandre da Rocha Curvelo J, de Oliveira Martins K, Capillé CL, *et al.* *Candida* species from oral cavity of HIV-infected children exhibit reduced virulence factors in the HAART era. *Microb Pathog.* 2017;102:74–81.

176. 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.* 2014;20(4):245-54.

177. Quindos G, San Millan R, Robert R, Bernard C, Ponton J. Evaluation of bichro-latex albicans, a new method for rapid identification of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1997;35(5):1263–5.

178. Ramani R, Gromadzki S, Pincus DH, Salkin IF, Chaturvedi V. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. J Clin Microbiol. 1998;36(11):3396–8.

179. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. Sensors (Basel). 2012;12(9):12347–60.

180. Reed BD, Gorenflo DW, Gillespie BW, Pierson CL, Zazove P. Sexual Behaviors and Other Risk Factors for *Candida* Vulvovaginitis. J Womens Health Gend Based Med. 2000;9(6):645–55.

181. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Rev. 1997;10(3):444–65.

182. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-ingroff A, Ghannoum MA, *et al.* Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro* —*in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clin Infect Dis. 1997;24(2):235–47.

183. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, *et al.* Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2000;30(4):662–78.

184. Reyes-Montes MDR, Duarte-Escalante E, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Frías-De León MG. Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. Rev Iberoam Micol. 2017;34(4):203–10.

185. Riesselman MH, Hazen KC, Cutler JE. Determination of antifungal MICs by a rapid susceptibility assay. J Clin Microbiol. 2000;38(1):333–40.

186. Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot W, Córdoba S, Canteros CE, *et al.* Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la República Argentina. Rev Argent Microbiol. 2005;37(4):189–95.

187. Romero M, Cantón E, Pemán J, Gobernado M. Antifúngicos inhibidores de la síntesis del glucano. *Rev Española Quimioter.* 2005;18(4):281–99.
188. Rousselle P, Freydiere AM, Couillerot PJ, De Montclos H, Gille Y. Rapid identification of *Candida albicans* by using albicans ID and Fluoroplate agar plates. *J Clin Microbiol.* 1994;32(12):3034–6.
189. Sahand IH, Ortiz R, Pemán J, Moragues MD, Quindos G, Ponton J. Identificación rápida de *Candida dubliniensis* mediante la prueba Bichro-Dubli®. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25(9):576–8.
190. San-Millán R, Ribacoba L, Pontón J, Quindós G. Evaluation of a commercial medium for identification of *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15(2):153–8.
191. Sanati H, Belanger P, Fratti R, Ghannoum MA. A new triazole, voriconazole (UK-109, 496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(11):2492–6.
192. Santolaya ME, Alvarado T, Queiroz-Telles F, Colombo AL, Zurita J, Tiraboschi IN, *et al.* Active surveillance of candidemia in children from Latin America: a key requirement for improving disease outcome. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(2):e40–4. doi: 10.1097/INF.0000000000000039.
193. Savini V, Catavittello C, Di Marzio I, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, *et al.* Pan-azole-resistant *Candida guilliermondii* from a leukemia patient's silent funguria. *Mycopathologia.* 2010;169(6):457–9.
194. Savini V, Catavittello C, Onofrillo D, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, *et al.* What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses.* 2011;54(5):434–41.
195. Schaller M, Korting HC, Borelli C, Hamm G, Hube B. *Candida albicans* -secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an *in vitro* model of vaginal candidiasis. *Infect Immun.* 2005;73(5):2758–65.
196. Schell RE. Proton permeability of renal membranes: influence of amphotericin-B. *Nephron.* 1993;63(4):481.

197. Segura LE, Kirchmayr MR, Flores EP, Gschaedler AC. PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *e-Gnosis*. 2010;8(2).
198. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassay for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37(5):1510-7.
199. Sendid B, Jouault T, Coudriau R, Camus D, Odds F, Tabouret M, *et al.* Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha- and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *J Clin Microbiol.* 2004;42(1):164–71.
200. Silva JO, Franceschini SA, Lavrador MA, Candido RC. Performance of selective and differential media in the primary isolation of yeasts from different biological samples. *Mycopathologia*. 2004;157(1):29–36
201. Siri L, Legarraga P, García P, González T, Rabagliati R. Cambios clínicos y epidemiológicos de candidemias en pacientes adultos desde 2000 a 2013. *Rev Chilena infectol.* 2017;34(1):19–26.
202. Slater DN, Wylde P, Harrington CI, Worth R. Systemic candidiasis : diagnosis from cutaneous manifestations. *J R Soc Med.* 1982;75(11):875–8.
203. Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Soll DR. “White-opaque transition”: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 1987;169(1):189–97.
204. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.* 2007;369(9577):1961–71.
205. Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE Jr. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2006;42(2):244–51.
206. St Germain G, Beauchesne D. Evaluation of the microscan rapid yeast Identification panel. *J Clin Microbiol.* 1991;29(10):2296–9.
207. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science.* 1999;283(5407):1535–8.

208. Staniszewska M, Bondaryk M, Swoboda-Kopec E, Siennicka K, Sygitowicz G, Kurzatkowski W. *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. Braz J Microbiol. 2013;44(3):813–21.

209. Swinne D, Raes-Wuytack C, Van Looveren K, Desmet P. Comparative evaluation of Fungitest-, Neo-Sensitabs and M27T-NCCLS broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. Mycoses. 1999;42(4):231–7.

210. TaylorCustom. Yeast Cell. Waltham, MA. [Internet]. [Consultado 1 Sep 2018]. Disponible en: <http://www.taylorcustom.com/yeast-cell-locket/>

211. Torres-Rodríguez JM, Alvarado-Ramírez E. *In vitro* susceptibilities to yeasts using the ATB FUNGUS 2 method, compared with Sensititre Yeast One and standard CLSI (NCCLS) M27-A2 methods. J Antimicrob Chemother. 2007;60(3):658–61.

212. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP, National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. 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.

213. Tsai PW, Chen YT, Hsu PC, Lan CY. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. Biomed. 2013;3(1):51–64.

214. Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;4(9): a019778.

215. Vanden Bossche H, Marichal P, Gorrens J, Geerts H, Janssen PA. Mode of action studies: Basis for the search of new antifungal drugs. Ann N Y Acad Sci. 1988;544:191–207.

216. Vásquez JA, Ramirez-Castrillón M, Monsalve-Fonnegra ZI. Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. Rev Colomb Biotecnol. 2016;18(2):129-39

217. Vázquez-González D, Perusquía-Ortiz AM, Hundeiker M, Bonifaz A. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. J Dtsch Dermatol Ges. 2013;11(5):381–93.

218. Vijgen S, Nys S, Naesens R, Magerman K, Boel A, Cartuyvels R. Comparison of Vitek identification and antifungal susceptibility testing methods to DNA sequencing and Sensititre YeastOne antifungal testing. *Med Mycol.* 2011;49(1):107–10.

219. Villalobos-Vindas JM, Castro Cordero JA, Avilés-Montoya A, Peláez-Gil MC, Somogyi-Perez T, Sandoval-Carpio L. Epidemiología de la candidemia en el Hospital México. *Acta Méd Costarric.* 2016;58(1):15–21.

220. Villanueva-Reyes J, Arenas R. Candidiasis mucocutánea. Una revisión. *Revista Mexicana de Micología.* 2007;25:91-104.

221. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, Collette L, Martino P, Vandercam B, *et al.* Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin Infect Dis.* 1999;28(5):1071–9.

222. Waldorf AR, Polak A. Mechanism of action of 5–fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;23(1):79-85.

223. Willinger B, Manafi M, Rotter ML. Comparison of rapid methods using fluorogenic-chromogenic assays for detecting *Candida albicans*. *Lett Appl Microbiol* 1994; 18: 47-49.

224. Xie X, Lipke PN. On the evolution of fungal and yeast cell walls. *Yeast.* 2010;27(8):479-88.

225. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect.* 2003;36(4):223–8.

226. Yucesoy M, Ozbek OA, Marol S. Comparison of three differential media for the presumptive identification of yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(3):245–7.

227. 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.

228. Zapata-González F, Cardona-Castro N. Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Rev CES Med.* 2012;26(1):71–83.

229. Zárate MS, Romano V, Nieves J, Smayevsky. Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Rev Argen Microbiol.* 2014;46(2):98–102.

230. Zhang L, Wang H, Xiao M, Kudinha T, Mao LL, Zhao HR, *et al.* The widely used ATB FUNGUS 3 automated readings in China and its misleading high MICs of *Candida* spp. to azoles: challenges for developing countries' clinical microbiology labs. PLoS One. 2014;9(12):e114004. doi: 10.1371/journal.pone.0114004. eCollection 2014.

231. Zhang L, Xiao M, Watts MR, Wang H, Fan X, Kong F, *et al.* Development of fluconazole resistance in a series of *Candida parapsilosis* isolates from a persistent candidemia patient with prolonged antifungal therapy. BMC Infect Dis. 2015;15:340. doi: 10.1186/s12879-015-1086-6.