



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES
DEL COMPLEJO *Candida parapsilosis* DE AISLADOS CLÍNICOS
DE UN CENTRO MÉDICO DE TERCER NIVEL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

MARÍA DE LOURDES GARCÍA HERNÁNDEZ



Ciudad de México

2017



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: Profesor: Abel Gutiérrez Ramos

VOCAL: Profesor: Alejandro Camacho Cruz

SECRETARIO: Profesor: Claudia Adriana Colín Castro

1er. SUPLENTE: Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

2° SUPLENTE: Profesor: Francisca Morayna Gutiérrez Luna

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Infectología, Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ), Instituto Nacional de Rehabilitación (INR)

Asesor del tema: M. en C. Claudia Adriana Colín Castro

Sustentante: María de Lourdes García Hernández

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Género <i>Candida</i>	2
2.1.1 Frecuencia y distribución	4
2.2 Complejo <i>Candida parapsilosis</i>	6
2.2.1 Identificación	7
2.3 Factores de virulencia	10
2.4 Formación de biopelículas	10
2.5 Antifúngicos	13
3. OBJETIVOS	15
4. METODOLOGÍA.....	16
4.1 Aislados clínicos y cepas tipo	16
4.2 Extracción de DNA y su cuantificación.....	16
4.3 PCR punto final del gen <i>MnSOD</i>	16
4.4 Digestión enzimática con Styl	17
4.5 Formación de biopelículas	18
4.6 Susceptibilidad a antifúngicos	19
5. RESULTADOS	21
5.1 Aislados del complejo <i>Candida parapsilosis</i>	21
5.2 Amplificación del gen <i>MnSOD</i>	21
5.3 Digestión enzimática con Styl	22
5.4 Distribución de las especies del complejo <i>Candida parapsilosis</i> en el INR..	23
5.5 Biopelículas de los miembros del complejo <i>Candida parapsilosis</i>	24
5.6 Susceptibilidad a anfotericina B y voriconazol de los miembros del complejo <i>Candida parapsilosis</i>	28
6. DISCUSIÓN	32
7. CONCLUSIONES.....	38
8. BIBLIOGRAFÍA	39

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas han ido aumentando desde 1980, afectan principalmente a pacientes inmunosuprimidos y hospitalizados, por lo que son un factor importante en la morbilidad y la mortalidad. ¹

Candida parapsilosis es la segunda especie de *Candida* aislada de pacientes con candidiasis invasiva (candidemia o candidiasis superficial) en ambientes hospitalarios. *C. parapsilosis* es un complejo formado por *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*, estas especies son indistinguibles por pruebas fenotípicas, incluso con el uso de equipos semi-automatizados es imposible realizar la diferenciación de especie. ^{2,3}

La identificación es importante debido a que algunos autores reportaron diferencias en susceptibilidad a antifúngicos, formación de biopelículas, expresión de otros mecanismos de resistencia y epidemiología hospitalaria.

Se ha reportado que la especie predominante del complejo es *C. parapsilosis sensu stricto*, seguida por *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. Las dos últimas especies representan solo el 10 % de las infecciones por el complejo *C. parapsilosis*. ^{2,3}

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Género *Candida*

El género *Candida* pertenece al reino *Fungi*, Subreino *Dikarya*, *Phylum Ascomycota*, sub *Phylum Saccharomycotina*, Clase *Saccharomycetes*, Orden *Saccharomycetales*, Familia *Debaryomycetaceae*. Comprende más de 200 especies, de las cuales alrededor de 20 son las que presentan infección en humanos, siendo *Candida albicans* la que se aísla con mayor frecuencia (45-85 %), aunque el grupo denominado no-*albicans*, que comprende las otras especies, va en aumento. ⁴⁻⁸ Desde 1990 el uso de antifúngicos como profilaxis y tratamiento redujeron la incidencia de infecciones severas por *C. albicans*, lo que permitió que las otras especies de *Candida* aumentaran. ⁹

Algunas especies de *Candida* forman parte de la microbiota de piel y mucosas, como el tracto respiratorio superior (boca, laringe, faringe) y vagina. Son microorganismos oportunistas que causan infección principalmente en las mucosas (boca, vagina) piel y uñas, que se denomina candidiasis, aunque también pueden afectar tejidos profundos o generar candidemia, las cuales son difíciles de tratar. ⁴⁻⁸ El principal factor para que las células comensales de *Candida* se vuelvan oportunistas es la depleción de las defensas del huésped, los hospederos que afecta son principalmente aquellos inmunocomprometidos, por ejemplo pacientes con neutropenia, carcinoma, VIH/SIDA, o aquellos que se relacionan con la presencia de un catéter (infección nosocomial) u otros dispositivos médicos. ⁹

El género *Candida* son levaduras, hongos unicelulares, eucariontes, aerobios, heterótrofos (saprófitos o parásitos), no móviles. Su pared celular está formada principalmente por quitina y su membrana por ergosterol, presentan vacuolas y núcleo pequeño. La mayoría son mesófilas (20 - 45°C), se desarrollan en medios neutros y ligeramente ácidos (pH 4.5 - 6.5), crecen en medios como Sabouraud dextrosa, papa dextrosa y extracto de levadura, el tiempo óptimo de crecimiento

varía entre 2 y 3 días a una temperatura de 25 a 30°C, forman colonias cremosas, planas, bien limitadas, de color blanco o blanco-amarillento. ^{4, 10}

La reproducción asexual de las levaduras pertenecientes a *Candida* spp. es por blastoconidios, que se generan por una célula madre por gemación. Los blastoconidios miden de 3-6 micras, las células presentan diversas morfologías dependiendo de la especie y de su estado de parasitación, pueden ser globosas, ovoides o elongadas.

Algunas especies de *Candida* presentan dimorfismo inverso, que consiste en formar pseudohifas: elongaciones de un blastoconidio, que se desarrollan en un medio nutricional pobre o cuando están parasitando. ^{4, 10}

En la **Figura 1** se presenta la diferencia entre una pseudohifa y una hifa verdadera.

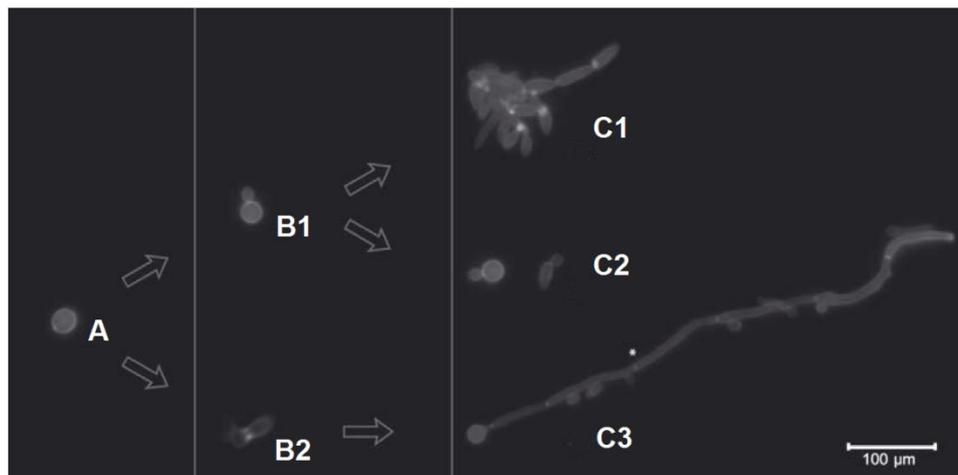


Figura 1. Diferentes morfologías de *C. albicans*. A) Blastoconidio, B1) Reproducción por gemación, B2) Formación de tubo germinal, C1) Formación de pseudohifa, C2) Forma de levadura, C3) Hifa. Imagen tomada de Silva *et al.* ¹¹

Para identificar a las especies del género *Candida* se realizan pruebas bioquímicas, pueden ser dos, el zimograma (fermentación del carbohidrato) y el segundo auxonograma (utilización del metabolito, usualmente carbohidratos). ^{4, 10,}

2.1.1 Frecuencia y distribución

La especie *C. albicans* ha sido la más frecuente en las infecciones causadas por el género *Candida*, sin embargo, desde 1990 se ha visto un incremento de otras especies del género, este es el caso de *C. parapsilosis*.¹

En estudios como los de Ing-Moi Hii y colaboradores se ha demostrado que la candidemia debida a *C. albicans* ha disminuido de 64.8 % a 43.6 %, mientras que *C. glabrata* y *C. parapsilosis* ha incrementado de 1.1 % a 21.6 % y de 2.2 % a 7.3 %, respectivamente.¹³

Javier Pemán y Miguel Salavert reportaron que en los estudios FUNGEMYCA (estudio epidemiológico multicéntrico realizado en 2009 de 44 centros hospitalarios por todo España: Andalucía, Aragón, Asturias, Baleares, Canarias, Castilla-La Mancha, Castilla-León, Cataluña, Comunidad Valenciana, Extremadura, Murcia, Galicia, Madrid, Navarra, País Vasco, las ciudades subrayadas son aquellas de las que se tuvo mayor número de aislamientos) y CANDIPOP (Estudio poblacional prospectivo sobre candidemia en España realizado entre 2010 y 2011 en 29 hospitales de las ciudades: Barcelona, Bilbao, Madrid, Sevilla y Valencia), *C. albicans* es la especie más aislada seguida por *C. parapsilosis* y *C. glabrata*, cercano a 45 %, 25 % y 12 % respectivamente.¹⁴

Además Noa Eliakim-Raz y colaboradores reportaron en 2016 a *C. albicans* como la especie más aislada en pacientes con candidemia en el área de medicina interna con un porcentaje de 41.1 %, seguida por *C. glabrata* 23.7 % y *C. parapsilosis* 15.2 %.¹⁵

Por otro lado, Kaur y colaboradores reportaron que las especies no-*albicans* van en aumento con una frecuencia de 63.3 %, mientras *C. albicans* sólo presenta el 36.7 %. De las especies no-*albicans*, *C. tropicalis* fue la más aislada seguida por *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, 41.1 %, 10 % y 6.7 % respectivamente.¹⁶

En México no hay estudios recientes en cuanto a la epidemiología por *Candida* spp. no obstante, Quindós y colaboradores hicieron una recopilación de información sobre las especies de *Candida* causantes de candidemia y candidiasis invasiva en diferentes países de los cinco continentes (por ejemplo: Sudáfrica, Estados Unidos, Colombia, China, Taiwán, España, Australia, entre otros) que se realizaron en diferentes periodos. Encontraron que, particularmente en México, la especie más frecuente es *C. parapsilosis* (37.9 %), seguida por *C. albicans* (31.9 %), *C. tropicalis* (14.8 %), *C. glabrata* (8 %), *C. krusei* (2.7 %); estos resultados pertenecen al periodo de 2004-2007 de aislados de hemocultivos.¹⁷

Por otra parte, en 2014 Corzo-León y colaboradores realizaron un estudio epidemiológico de *Candida* spp. en hemocultivos en dos centros: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), donde reportaron a *C. albicans* como la especie más frecuente (46 %), seguida por *C. tropicalis* (26 %), *C. glabrata* (13.5 %), *C. parapsilosis* (5 %), *C. krusei* (5 %), *C. guilliermondii* (3 %), *C. lipolytica* (1 %).¹⁸

En el Centro Nacional de Investigación y Atención del Paciente Quemado (CENIAQ), del Instituto Nacional de Rehabilitación, se realizó un estudio observacional retrospectivo de 2011-2015, donde se reporta que la distribución de las especies de *Candida* es: *C. albicans* (39.9 %), *C. glabrata* (24.6 %), *C. tropicalis* (17.0 %), *C. parapsilosis* (10.7 %), *C. krusei* (2.1 %). Particularmente analizando los aislados de hemocultivos los resultados son: *C. parapsilosis* (52.2 %), *C. albicans* (41.3 %), *C. tropicalis* (4.4 %), ubicando a *C. parapsilosis* como la especie de *Candida* que se aísla con mayor frecuencia en hemocultivos en esta institución.

2.2 Complejo *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis es considerado como habitante normal de la piel, es aislado con frecuencia del espacio subungueal de individuos sanos y es considerado como parte de la microbiota.^{19, 20}

C. parapsilosis se aisló y se relacionó por primera vez a infección en 1940 en un caso de endocarditis. Posteriormente se estableció que su vía de patogenicidad podría ser exógena: candidemia asociada a catéter, a dispositivos médicos invasivos y por soluciones de hiperalimentación intravenosa.^{1, 21}

Estudios recientes colocan a *C. parapsilosis* como la segunda especie de *Candida* aislada de hemocultivos en Latinoamérica y Asia^{1, 21-24} Canadá y Europa²³, así mismo, es la segunda especie aislada de pacientes con candidiasis invasiva en ambientes hospitalarios.^{2, 25, 26}

C. parapsilosis afecta a pacientes inmunocomprometidos, sin embargo la principal población de la que se ha aislado es de neonatos y niños, en la que frecuentemente se asocia con mortalidad. Dado que la colonización de la piel o el tracto gastrointestinal es el primer paso en la patogénesis de enfermedad fúngica invasiva, los neonatos son propensos a la infección debido a que tienen comprometida la integridad cutánea y son susceptibles a infección del tracto gastrointestinal por incubación endotraqueal.^{1, 20}

Los pacientes con quemaduras presentan ciertas características que promueven la infección fúngica: pérdida de la barrera cutánea, la baja respuesta inmunitaria (innata y adaptativa), tratamiento con antibacterianos de amplio espectro, uso de un catéter venoso central. *Candida* spp. es el principal hongo aislado de pacientes quemados. Renau *et al.* reportaron que en pacientes con quemaduras, *C. albicans* fue la más aislada (61.1 %), seguida por *C. parapsilosis* (27.8 %), *C. krusei* (5.6 %), *C. glabrata* (2.8 %) y *C. tropicalis* (2.8 %).²⁷ Vinsonneau *et al.* también reportan a *C. albicans* (65 %) como la principal especie aislada en pacientes con quemaduras y a *C. parapsilosis* como la segunda (25 %).²⁸

Las infecciones osteoarticulares producidas por *Candida* spp. son poco frecuentes, pero están asociadas con una morbilidad significativa. Usualmente se vinculan a una complicación de cirugía, y los pacientes una vez que presentan a esta levadura como patógena, tienen alta posibilidad de recaer en la infección. Miller *et al.* y Neofytos *et al.* reportaron que la principal especie de *Candida* aislada en infecciones osteoarticulares es *C. albicans* (61 % y 56.6 %, respectivamente) seguida por *C. parapsilosis* (30 % y 18.9 %, respectivamente).^{29, 30}

2.2.1 Identificación

Las colonias de *C. parapsilosis* en Sabouraud dextrosa agar son blancas, cremosas, brillantes, lisas y limitadas, ver **Figura 2, panel A**; microscópicamente se observan blastoconidios ovales o redondos, generalmente alargados, en la **Figura 2, panel B** se muestra una preparación en fresco.¹

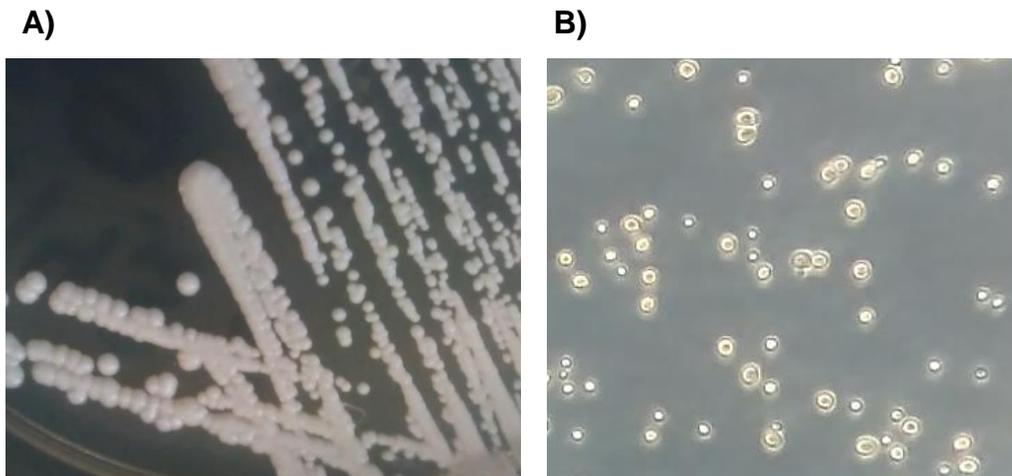


Figura 2. Morfología de *C. parapsilosis*. A) Macroscópica, se observan colonias blancas, brillantes, lisas y limitadas en medio Sabouraud dextrosa agar. B) Microscópica, presenta blastoconidios ovales o redondos, generalmente alargados.

Derivado de análisis moleculares, se demostró que *C. parapsilosis* se divide en tres grupos genotípicamente diferentes: grupo I, II y III. Se comprobó por RAPD (*Random amplified Polymorphic DNA*) y por secuenciación del *Internal transcribed spacer* (ITS), secuencias de DNA mitocondrial, DNA de topoisomerasa II, sonda tipo oligonucleótido utilizada para *finger printing*, la existencia de subespecies.²¹

En 2005 Tavanti y colaboradores realizaron tipificación de secuencias multilocus, analizaron las diferencias de los tres grupos y los definieron como *C. parapsilosis sensu stricto* (grupo I), *C. orthopsilosis* (grupo II) y *C. metapsilosis* (grupo III), fue entonces cuando se definió a *C. parapsilosis* como un complejo que no se puede diferenciar por pruebas fenotípicas.²¹

Diversas técnicas moleculares se han utilizado para la identificación de las especies del complejo, incluyendo la PCR del gen que codifica para *secondary alcohol dehydrogenase (sadh)* seguida por digestión enzimática con *BanI* (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), secuenciación de genes ribosomales y análisis de microsatélites; cada técnica tiene ventajas y limitaciones.^{19, 20, 22} Por ejemplo, la técnica PCR-RFLP tiene alta especificidad y sensibilidad, es reproducible y los resultados pueden obtenerse en pocas horas³¹; la técnica por RAPD involucra la amplificación de fragmentos aleatorios de DNA por PCR utilizando un solo oligo de secuencia arbitraria, el cambio en una base del genoma cambia el patrón de amplificación lo que permite identificar polimorfismo en el DNA, esta técnica tiene alta especificidad, es simple, de bajo costo, rápida, aunque presenta una desventaja, es poco reproducible, las concentraciones y condiciones de PCR influyen mucho en los resultados por lo que es necesario estandarizar en el laboratorio.^{32, 33}

Las superóxido dismutasas son un grupo de metaloenzimas que catalizan la dismutación de aniones superóxidos, de estas, aquellas que utilizan como cofactor al manganeso se denominan MnSOD. Las células fúngicas contienen enzimas MnSOD homotetraméricas en la matriz mitocondrial, estas juegan un papel importante en la defensa celular contra el estrés oxidativo durante la invasión del huésped.³⁴

Se han establecido las secuencias del gen *MnSOD* en diversos hongos, incluyendo a especies del género *Candida*, lo que ha permitido la realización de árboles filogenéticos. Además se ha comparado con secuencias SSU rRNA (*small*

subunit ribosomal RNA), el resultado es que este gen presenta poca variabilidad, que asemeja a los genes ITS1 e ITS2. Estas características posicionan al gen *MnSOD* como una adecuada herramienta molecular para identificación de especies fúngicas cercanamente relacionadas.³⁴

Se ha reportado que la especie predominante del complejo es *C. parapsilosis sensu stricto*, seguida por *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. Las dos últimas especies representan solo de 1 al 10 % de las infecciones por el complejo *C. parapsilosis*, aunque se ha visto que estas especies han ido incrementando desde el año 2004. Su aislamiento depende del área geográfica y la muestra analizada.^{2, 20, 22, 35}

Se ha reportado a *C. metapsilosis* como la menos virulenta, menos eficiente para fagocitar y más susceptible a respuesta del hospedero, dado que causa una infección menor en ensayos *in vitro* en diversas líneas celulares e *in vivo* en candidiasis vaginal.^{2, 35-37} Referente a este punto, Francesca y colaboradores analizaron la virulencia de los miembros del complejo *C. parapsilosis*, para lo que realizaron diversos estudios en la línea celular de microglia BV2. Sus resultados muestran que *C. metapsilosis* fue la especie con menor crecimiento, en cuanto a la fagocitosis es menos susceptible a ella, sin embargo una vez formado el fagosoma, las vacuolas contenedoras de *C. metapsilosis* tienen alto grado de acidificación. Concluyeron que, *C. metapsilosis* causa menor daño a la línea celular y es la menos virulenta en comparación con las otras dos especies.³⁸

La identificación de las especies del complejo *C. parapsilosis* es importante debido a que algunos estudios presentan diferencias entre ellas cuanto a susceptibilidad a antifúngicos, formación de biopelículas, expresión de otros mecanismos de virulencia, como la secreción de enzimas hidrolíticas y epidemiología hospitalaria, por lo que su identificación puede tener un gran impacto en el uso terapéutico.^{2, 19, 35, 39}

2.3 Factores de virulencia

Para establecer la infección, los patógenos oportunistas como *Candida* spp. deben cumplir con ciertas funciones: colonización, penetración epitelial y diseminación vascular, por lo que requieren expresar ciertos factores de virulencia.⁹ En candidiasis invasiva los principales factores de virulencia son: 1) Expresión de adhesinas de superficie que le permiten la adherencia a las células del hospedero, 2) Formación de biopelículas, 3) Secreción de enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasas), que permiten la supervivencia de la célula a los macrófagos y neutrófilos, 4) Cambio fenotípico, que le da la capacidad de adaptarse al microambiente a través de alteraciones en su metabolismo, morfología, y propiedades superficiales de la célula, y 5) Morfogénesis, que consiste en formar pseudohifas. Estos factores le permiten escapar y superar las defensas del hospedero.^{1, 9, 36}

C. parapsilosis tiene la capacidad de adherirse a células y tejidos, principalmente a superficies mucosas, elemento crucial para facilitar la colonización y la infección. La adherencia de *C. parapsilosis* puede ser resultado de la coadherencia de muchas levaduras causando agregados en las superficies epiteliales, tal como ocurre con *C. albicans*. Así mismo, existe una relación estrecha entre la adherencia y la formación de biopelículas, cuando las levaduras se adhieren a dispositivos médicos promueven la formación de biopelículas y como consecuencia daño celular.^{1, 36}

2.4 Formación de biopelículas

Las biopelículas son comunidades de microorganismos adheridas a una superficie que permanecen unidas por secreciones de sustancias poliméricas sintetizadas por ellos mismos que se denomina matriz extracelular. Las biopelículas son el tipo de crecimiento microbiano más prevalente, se considera como uno de los factores de virulencia más importantes a nivel clínico, puede conferir resistencia o

tolerancia a antifúngicos dado que la penetración de sustancias está limitada y la matriz protege de la respuesta inmune del hospedero. Por si mismas, las biopelículas son un reservorio para infecciones persistentes. ^{1, 4, 20, 23, 25, 26, 40}

La formación de biopelículas es un proceso complejo, consta de distintas etapas: la adhesión, iniciación y maduración. ^{26, 41} Ver **Figura 3**.

La primera etapa es la adhesión, se genera un cambio en la morfología de la levadura que permite que se adhiera a tejidos del hospedero o dispositivo médicos. ¹ En esta etapa están involucrados distintos parámetros como son la hidrofobicidad y aspereza de la superficie, el medio de cultivo y la expresión de moléculas de adhesión por las levaduras; se estableció que el incremento de la hidrofobicidad y aspereza en las superficies favorecen la formación de la biopelícula. ^{26, 40}

La segunda fase es la de iniciación, en esta etapa las células de levaduras adheridas se multiplican y desarrollan hifas o pseudohifas. Algunas moléculas de adhesión solo se expresan en las hifas, como *Als3* y *Hwp1*, por lo que son esenciales para establecer biopelículas fuertes. Las cepas de *C. parapsilosis* productoras de pseudohifas generan biopelículas en mayor cantidad y más invasivas. ²⁶

La tercera etapa es la maduración, en esta fase se produce una matriz extracelular compuesta por carbohidratos, en esencial beta-1,3 glucano, hexosamina, fósforo y ADN extracelular que en conjunto fortalecen la biopelícula. ²⁶

Holland y colaboradores (2014) describen una fase final en la que ocurre el desprendimiento de las levaduras de la biopelícula con el fin de diseminarse y establecerse en un nuevo sitio de infección. ⁴¹ Ver **Figura 3**.

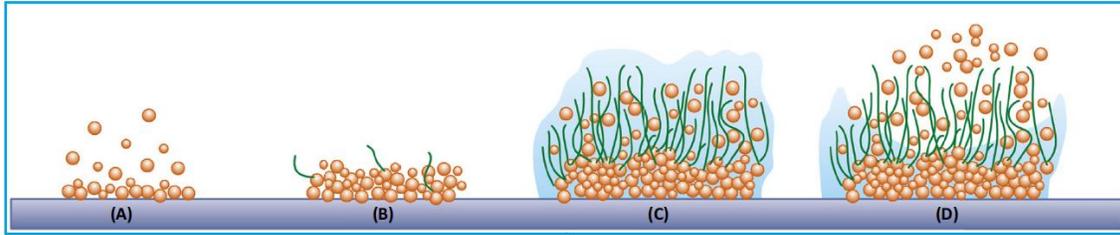


Figura 3. Etapas de la formación de biopelículas en *Candida* spp. A) Adhesión: cambio morfológico en la levadura donde expresa moléculas de adhesión. B) Iniciación: crecimiento y desarrollo de hifas y pseudohifas. C) Maduración: producción de matriz extracelular. D) Dispersión: Diseminación de la levadura a un nuevo sitio de infección. Imagen tomada de Araújo *et al.* ⁴²

La producción de biopelículas se evalúa por diferentes técnicas: tinción con cristal violeta, para medir la biomasa; ensayo de reducción con XTT (*2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide salt*), para medir la viabilidad de la célula; microscopia electrónica de barrido, para evaluar la estructura de la biopelícula. ^{23, 43} El ensayo de XTT se basa en la actividad metabólica de la célula, las succinoxidasas y el sistema citocromo P450 que se encuentran en las mitocondrias de células viables, estas enzimas convierten el XTT a formazán, un producto soluble que se puede leer a 492 nm. ⁴⁴

La tinción con cristal violeta es el ensayo más fiable para la determinación de la formación de biopelículas porque considera a las células metabólicamente activas e inactivas de la biopelícula. ²³

Se considera que el mayor factor de virulencia de *C. parapsilosis* es su capacidad de formar biopelículas, aunque comparadas con las de *C. albicans* son menos complejas estructuralmente. ²⁶ Se desarrollan en la superficie de dispositivos permanentes y materiales protésicos en pacientes que requieren uso prolongado de catéter central y/o nutrición parenteral. ^{20, 23, 25, 45}

2.5 Antifúngicos

Los antifúngicos que se utilizan actualmente para el tratamiento de infecciones fúngicas son el grupo de azoles, polienos, equinocandinas y pirimidinas.¹²

Los antifúngicos azólicos son los principales en el tratamiento para infecciones por *Candida* spp. Son fungiestáticos, inhiben el producto del gen *ERG1*, la enzima 14 α - lanosterol demetilasa, lo que lleva a la presencia de esteroides metilados en la membrana en lugar del ergosterol, esto provoca que las proteínas de la membrana pierdan su función, aumenta la fluidez de la membrana y en conjunto, se inhibe el crecimiento y la división celular del hongo.^{4, 9, 46} Los azoles se dividen en dos grupos: imidazoles y triazoles. Ketoconazol, miconazol y clotrimazol se incluyen en el grupo de los imidazoles, su uso se limita a infecciones localizadas e infecciones superficiales. Para las infecciones sistémicas se utilizan los triazoles: fluconazol, voriconazol e itraconazol.⁹

Algunas especies de *Candida* son resistentes a fluconazol, aunque el porcentaje es poco; *C. krusei* tiene resistencia intrínseca a este antifúngico. El fluconazol se administra en la mayoría de los casos de candidiasis, por ejemplo en pacientes inmunosuprimidos, con VIH/SIDA, trasplantes y con largos periodos hospitalarios. Voriconazol es un triazol de segunda generación, se utiliza en casos graves de candidiasis o en caso de resistencia a fluconazol, ya que es un antifúngico de amplio espectro.⁴

Los polienos son compuestos anfipáticos, es decir, que poseen una parte hidrofílica e hidrofóbica en su molécula. Los polienos se unen al ergosterol de la membrana de los hongos, creando un poro que permite la difusión de moléculas pequeñas a través de la membrana, lo que lleva a la muerte de la célula. La anfotericina B se incluye en este grupo, debido a su nefrotoxicidad, se utiliza en caso de que el paciente no responda a los azoles o en caso de infecciones invasivas severas.^{1, 9}

Las equinocandinas inhiben la 1,3-beta-d-glucano sintetasa, enzima importante para la síntesis de glucano, componente esencial de la pared celular de la levadura.⁹ La caspofungina es una equinocandina de espectro moderado, y la micafungina, que pertenece también a este grupo, se utiliza para candidiosis invasiva o en caso de resistencia a triazoles y anfotericina B, se considera como el mejor antimicótico sistémico en neonatos y niños.⁴

En el grupo de las pirimidinas se encuentra a 5-flucitosina. Los hongos sintetizan a la enzima citosina deaminasa que convierte a 5-flucitosina en 5-fluorouracilo, compuesto que inhibe la función y división celular al incorporarse al DNA y RNA.⁹

Las especies de *Candida* muestran diferencias en la respuesta a antifúngicos, por lo que la identificación y la evaluación de la susceptibilidad son parámetros que se deben considerar al elegir la terapia.¹²

Existen dos guías que describen la metodología para evaluar la susceptibilidad, la primera es estadounidense: CLSI (*Clinical Laboratory Standar Institute*), la segunda es europea: EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Para evaluar la susceptibilidad en levaduras, ambas guías proponen realizar microdilución en caldo.⁴⁷

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar y diferenciar las especies del complejo *C. parapsilosis* de aislados clínicos de pacientes del INR empleando PCR y digestión enzimática.

Objetivos específicos

- Verificar viabilidad de los aislados de complejo *C. parapsilosis* existentes en el cepario del laboratorio de Infectología (INR).
- Extraer el DNA genómico de los aislados usando resina Chelex®.
- Realizar PCR punto final de los aislados, amplificando el gen *MnSOD* (manganeso superóxido dismutasa).
- Purificar productos de PCR y realizar digestión enzimática con Styl.
- Realizar pruebas de susceptibilidad a antifúngicos bajo las guías de CLSI.
- Evaluar la formación de biopelículas por ensayo con cristal violeta.
- Analizar si existe diferencias en la formación de biopelículas entre los miembros del complejo *C. parapsilosis*.
- Analizar si existe diferencias en la resistencia a antifúngicos anfotericina B y voriconazol, que pueda ser relacionadas con los miembros del complejo *C. parapsilosis*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Aislados clínicos y cepas tipo

Se incluyeron 167 aislados de *C. parapsilosis*, identificados con el sistema Vitek (Biomérieux, Francia). Estos se obtuvieron de muestras clínicas: hemocultivos, urocultivos, biopsias, puntas de catéter, heridas, índices de colonización, aspirados, líquidos sinoviales y sonicados de prótesis de pacientes hospitalizados del INR (del área de quemaduras u ortopedia) en un periodo de junio 2011 a agosto 2016.

Cada aislado se descongeló de -70°C, se sembró en agar Sabouraud con ceftazidima (128 µg/mL) y se incubó a 30°C por 24 horas para tener a la cepa viable. Como cepas de referencia se utilizó a *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 y *C. albicans* ATCC 10231.

4.2 Extracción de DNA y su cuantificación

La extracción de DNA se realizó con la resina Chelex® (BioRad, EUA). La resina Chelex® tiene afinidad a todas las moléculas excepto al DNA. Se colocaron 200 µL de la resina en un vial de 1.5 mL y se realizó una suspensión con un par de colonias obtenidas del agar Sabouraud, la suspensión se sometió a 94°C durante 45 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante para ser almacenado a -20°C.

El DNA fue cuantificado en equipo Nano Drop (Thermo Fisher, EUA).

4.3 PCR punto final del gen *MnSOD*

La PCR punto final se realizó con el equipo Veriti (Applied Biosystems, EUA). Para cada reacción, con volumen final de 50 µL, se colocaron 5 µL de buffer Tris, 2 mM de Mg²⁺, 0.2 mM de cada dntp (dinucleótido trifosfato), 0.2 µM de cada primer: MnSODF (5´ GCTTAGTGGACAAATCAATGAYCT 3´), MnSODR (5´

AGTTGATGTAACCACCACCR TTG 3'); 1.5 U de enzima TaqMan® y 10 ng de DNA. Se usaron oligonucleótidos degenerados, es decir, son oligos que tienen un número de opciones en un posición de la secuencia, esto para permitir el reconocimiento de una variedad de secuencias relacionadas, por esa razón se observa Y y R en las secuencias, la posición Y indica que puede haber C o T; la posición R, A o G.

Las condiciones de PCR empleadas fueron: 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 45 segundos, 58°C por 55 segundos y a 72°C por 60 segundos, finalmente, a 72°C por 7 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis a 110 volts durante 60 minutos en gel de agarosa al 2 %, teñido con SYBR Green. Como control positivo se utilizó a la cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019, y como controles negativos a *C. krusei* ATCC 6258 y *C. albicans* ATCC 10231.

Para *C. parapsilosis* el amplicón es de 171 pb; para *C. orthopsilosis*, 235 pb; para *C. metapsilosis*, 250 pb.

4.4 Digestión enzimática con Styl

Los productos de PCR que se digirieron con la enzima Styl (*New England BioLabs®* Inc.) previamente se purificaron mediante la técnica de precipitación con Isopropanol/Etanol de la siguiente manera: a 25 µL del producto de PCR se adicionó 90 µL de isopropanol (75 %), se mezcló en el vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 25 minutos; posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 25 minutos y se descartó el sobrenadante. Se adicionó 200 µL de etanol (70 %) se mezcló en el vórtex y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante. El pellet se secó a 80°C por 2 minutos y se resuspendió en 10 µL de agua estéril.

Para la digestión enzimática, con volumen final de 50 µL, se colocó 5 µL de buffer, 10 U de enzima Styl y 1 µg de DNA. La mezcla se incubó a 37°C por 20 minutos y

posteriormente los fragmentos se analizaron por electroforesis a 90 volts por 50 minutos en un gel de agarosa al 2 % teñido con SYBR Green.

La enzima de restricción Styl reconoce secuencias parcialmente palindrómicas, con un sitio de reconocimiento (CCAAGG) y un sitio de corte (entre las dos citosinas: **CCAAGG**) que se realiza en la secuencia del amplicón del gen *MnSOD* en *C. orthopsilosis*, por lo que genera dos fragmentos, uno de 165 pb y otro de 70 pb que se pueden visualizar por electroforesis. ² Ver **Figura 4**.

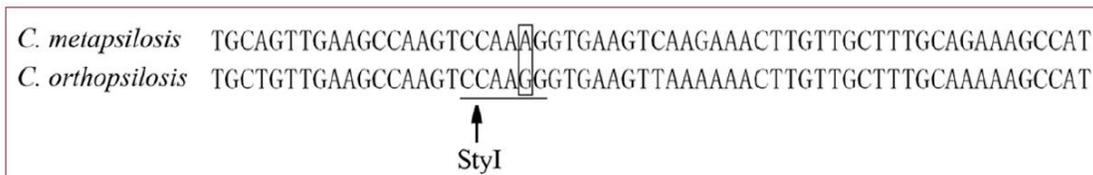


Figura 4. El sitio de reconocimiento por la enzima Styl en la secuencia de *C. orthopsilosis* está subrayado y el corte se indica con la flecha. El recuadro representa como el cambio de nucleótido hace que la enzima no reconozca y por ende, no realice el corte en *C. metapsilosis*. Imagen tomada de Xiaobo *et al.* ²

4.5 Formación de biopelículas

Cada uno de los aislados se sembró en agar Sabouraud a 28°C por 24 h. Las colonias aisladas se sembraron en medio YPD (*yeast peptone dextrose*) a 35°C por 24 h. Se realizó una suspensión al 0.5 en escala de McFarland en caldo YPD. El crecimiento de la biopelícula se realizó en una placa de 96 pozos, se colocó 180 µL de medio YPD y posteriormente se añadió 20 µL de la suspensión de cada aislado. La placa se incubó a 35°C por 72 h en condiciones estáticas. Pasado el tiempo de incubación, se descartó el medio y se realizó un lavado con solución salina isotónica (SSI). Cada pozo se tiñó con 200 µL de cristal violeta al 2 % (CV) durante 30 minutos y posteriormente se realizó un lavado con SSI. Se agregaron 150 µL de etanol a 99.7% en cada pozo de la placa y en cada uno de ellos se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm. La relación es directamente proporcional, si hay mayor absorbancia, hay mayor cantidad de biomasa y por ende, mayor producción de biofilm.

Cabe mencionar que cada aislado se evaluó por triplicado. Como control positivo se utilizó a *C. albicans* ATCC 10231, cepa productora de biopelícula.

4.6 Susceptibilidad a antifúngicos

La susceptibilidad en este estudio se evaluó por la prueba de microdilución en caldo según lo establece la guía M27-A3 de CLSI.⁴⁸

Se utilizó el medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute médium*) 1640 con glutamina y sin bicarbonato de sodio, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS), ajustado a pH 6.9-7.1. Para los antifúngicos anfotericina B y voriconazol se preparó la solución stock a 1600 µg/mL y se realizaron diluciones seriadas hasta 3.12 µg/mL utilizando como diluyente a DMSO.⁴⁸

De estas soluciones se realizó una dilución 1/50 en medio RPMI y se realizó el llenado de las placas de 96 pozos con 100 µL cada uno de la columna 1 a la 10 (16 - 0.0312 µg/mL). La columna 11 se llenó con 100 µL de RPMI con 2 % de DMSO, y funcionó como control de crecimiento, mientras que la columna 12 se llenó con 200 µL de RPMI como control de esterilidad. Cada uno de los aislados se sembró en agar Sabouraud y se incubó a 35°C por 24 h. Se realizó una suspensión al 0.5 en escala de McFarland en RPMI, se hizo una dilución 1/1000 en RPMI y 100 µL de esta solución se inoculó en cada pozo. Las placas se incubaron a 35°C por 48 h y finalmente se realizaron las lecturas de la concentración mínima inhibitoria (MIC). *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 se utilizaron como controles en la susceptibilidad a los antifúngicos evaluados.⁴⁸

La MIC se determinó de acuerdo con el documento M27-A3 de CLSI, así mismo, se obtuvieron las MIC₅₀ y MIC₉₀ para cada grupo del complejo *C. parapsilosis*.⁴⁸

La susceptibilidad a voriconazol se determinó como establece CLSI en el documento M27-S4 para *C. parapsilosis*: Susceptible (S) ≥ 0.12 , susceptible dependiente de dosis (SDD) 0.25-0.5, resistente (R) ≥ 1 . CLSI no presenta puntos de corte para la interpretación de susceptibilidad a anfotericina B, sin embargo varios autores han referido como *wild type* (WT) una MIC ≤ 1 y *non wild type* (nWT) >1 .^{12, 49}

5. RESULTADOS

5.1 Aislados del complejo *Candida parapsilosis*

Se recuperaron 167 aislados de complejo *C. parapsilosis*. Las muestras en las que se identificó con mayor frecuencia fueron índices de colonización (hisopados de pliegues, orofaríngeo e hisopados transrectales), seguido de biopsias y hemocultivos, sin descartar el número de aislados de puntas de catéter intravascular, urocultivos (sonda y chorro medio) e hisopados, y con menor frecuencia en aspirados, heridas, líquidos sinovial y sonicado de prótesis. Ver **Figura 5**.

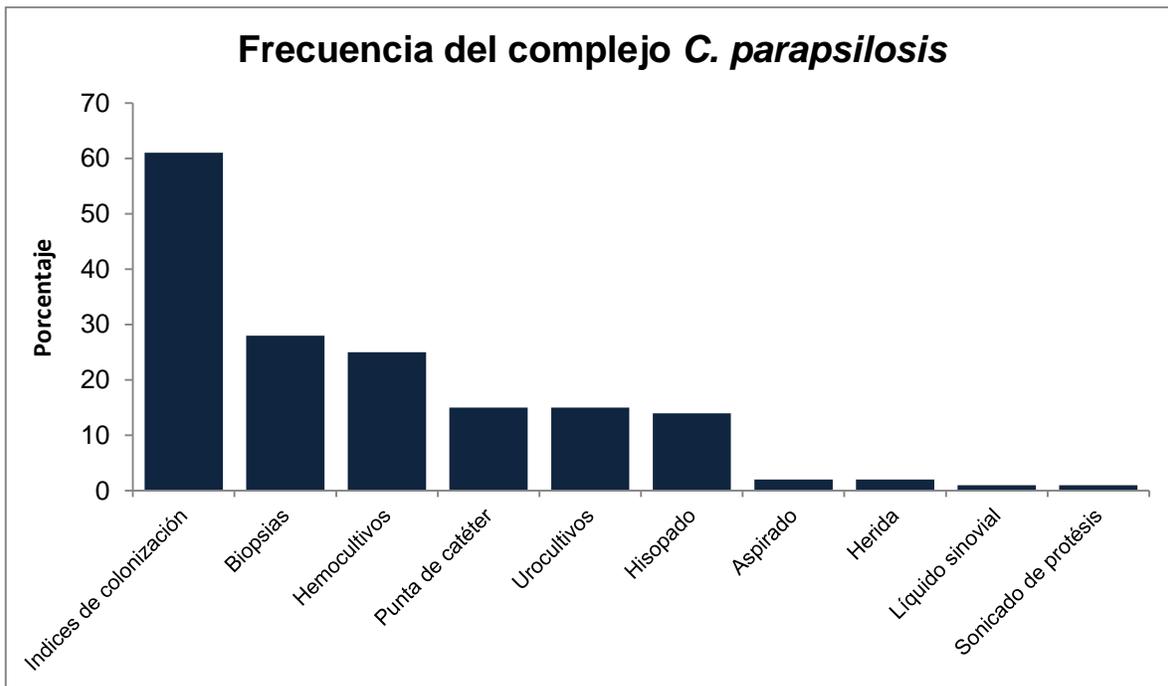


Figura 5. Frecuencia del complejo *C. parapsilosis* en el INR por tipo de muestra.

5.2 Amplificación del gen *MnSOD*

De las extracciones realizadas con resina Chelex®, la cuantificación de DNA se obtuvo en un intervalo de 50 ng/μL a 100 ng/μL.

En la **Figura 6** se presenta la electroforesis de los productos de PCR punto final del gen *MnSOD* de 6 aislados clínicos. Las bandas de los carriles 1, 2, 3 y 6 son de 171 pb; los carriles 4 y 5 tienen una banda entre 200 y 250 pb, el carril 7 representa el control negativo de la PCR.

Se obtuvo que sólo catorce de los aislados clínicos presentan amplicones con peso entre 200 y 250 pb. El tamaño de producto de PCR, o amplicón, de los aislados restantes es de 171 pb.

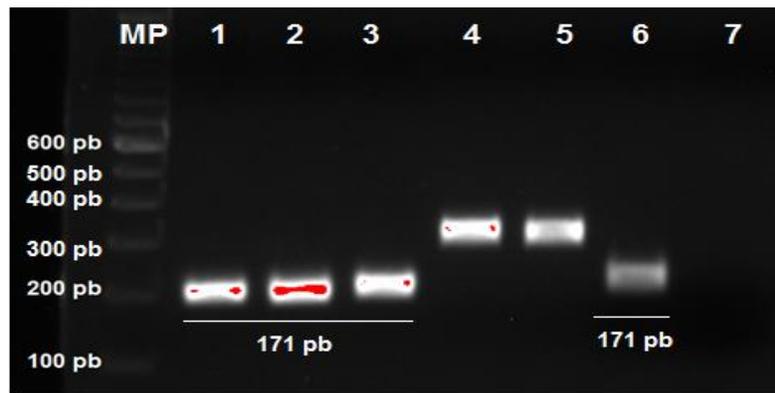


Figura 6. Gel de agarosa después de la electroforesis de los productos de PCR del gen *MnSOD*. Carril 1 a 6, muestras clínicas. Carril 7, control negativo de PCR. MP: marcador de peso molecular DNA 100pb.

5.3 Digestión enzimática con Styl

En la **Figura 7** se presenta el gel de electroforesis después de la digestión enzimática de cuatro aislados. El carril 1 presenta una banda de 171 pb, el carril 2, una banda de 250 pb. En el carril 3 se observan dos bandas: una de 165 pb y una de 70 pb. El carril 4 representa el control negativo de la digestión.

La enzima Styl sólo realiza un corte en *C. orthopsilosis*, lo que genera dos fragmentos: 165 pb y 70 pb.

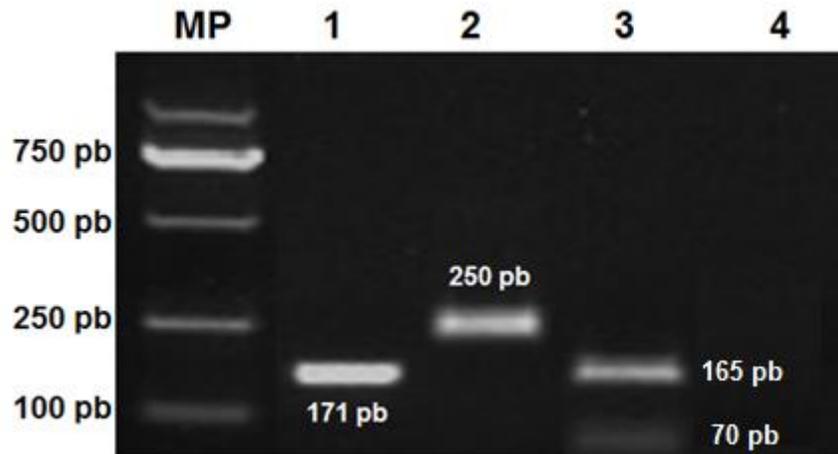


Figura 7. Gel de agarosa de la electroforesis de la digestión enzimática con Styl. MP, Marcador de peso molecular; carril 1, *C. parapsilosis*; carril 2, producto de la digestión con Styl de *C. metapsilosis*; carril 3, producto de digestión enzimática correspondiente a *C. orthopsilosis*; carril 4, control negativo.

De los catorce amplicones sometidos a digestión enzimática, seis fueron cortados por la enzima Styl.

5.4 Distribución de las especies del complejo *Candida parapsilosis* en el INR

La **Tabla 1** presenta la distribución de la especies del complejo *C. parapsilosis* por el tipo de muestra de junio 2011 a agosto 2016 en INR. La especie más frecuente del complejo es *C. parapsilosis sensu stricto* (91.6 %), seguida por *C. metapsilosis* (4.8 %) y siendo *C. orthopsilosis* la menos aislada (3.6 %).

Tabla 1. Distribución de *Candida parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

Tipo de muestra	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	Total
Índice de colonización	57	1	3	61
Biopsias	25	3	0	28
Hemocultivo	23	1	1	25
Punta de catéter	14	0	1	15
Urocultivos	15	0	0	15
Hisopado	13	0	1	14
Aspirado	2	0	0	2
Herida	2	0	0	2
Líquido sinovial	0	1	0	1
Sonicado de prótesis	0	1	0	1
Otros	2	1	0	3
Total	153 (91.6%)	8 (4.8%)	6 (3.6%)	167

5.5 Biopelículas de los miembros del complejo *Candida parapsilosis*

En la **Figura 8, panel A** se muestra un ejemplo del crecimiento y la formación de biopelículas de aislados del complejo *C. parapsilosis* después de las 72 horas de incubación; en el **panel B** se presenta la placa ya teñida con cristal violeta.

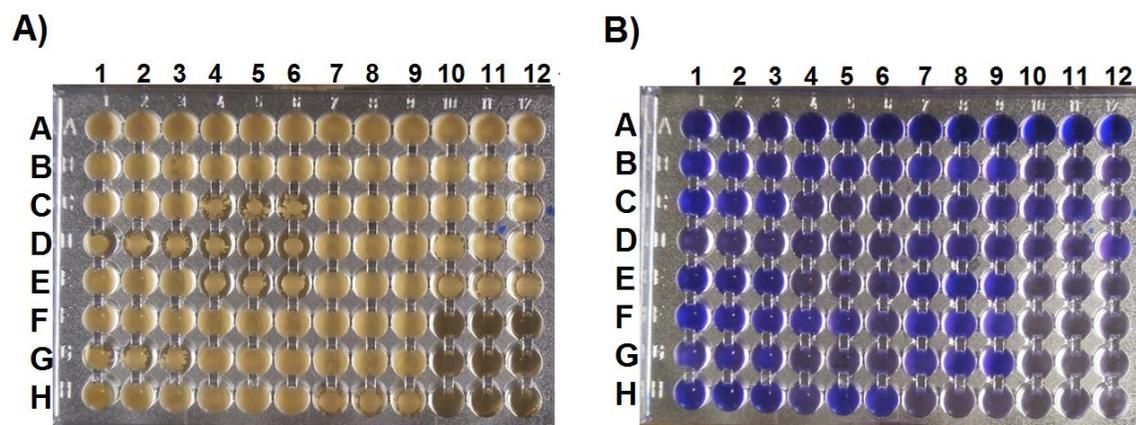


Figura 8. Formación de biopelículas de aislados del complejo *C. parapsilosis*. A) Placa de 96 pozos incubada 72 h a 35°C, crecimiento de biopelícula y levaduras dispersas en medio YPD. B) Placa de 96 pozos después de los lavados y la tinción con CV. Los pozos F: 10, 11, 12; G: 10, 11, 12; H: 10, 11, 12 son los blancos.

Después de las 72 h de incubación, la producción de biopelícula fue muy variable para todos los aislados, incluso entre aquellos que pertenecen a la misma subespecie. Lo anterior se puede observar a detalle en las **figura 9, 10 y 11**, las cuales representan la cuantificación de la biopelícula en los diferentes aislados por tipo de muestra: la **figura 9** muestra la formación de biopelícula en los aislados identificados como *C. metapsilosis*; la **figura 10**, los de *C. orthopsilosis* y la **figura 11** los correspondientes a *C. parapsilosis sensu stricto*. Se identificaron cepas altamente productoras de biopelícula y otras con baja formación de la biopelícula independientemente del tipo de muestra y de la subespecie.

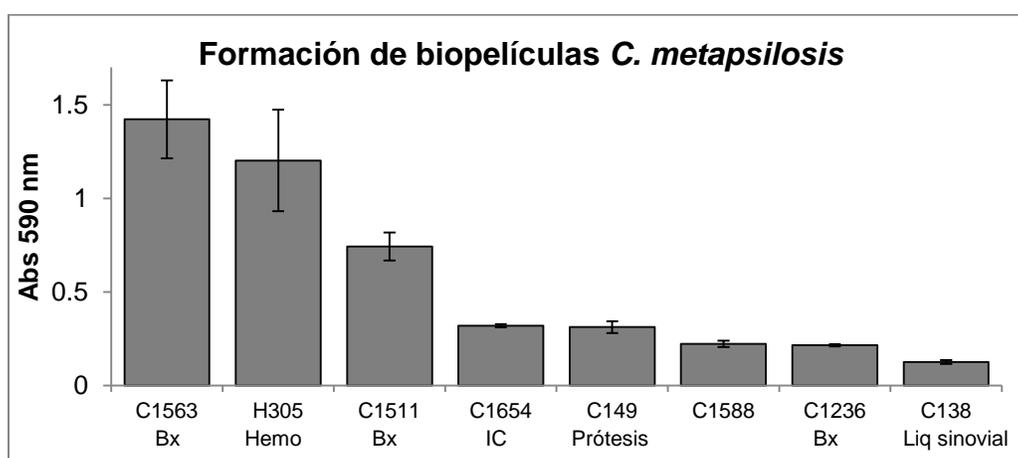


Figura 9. Cuantificación de producción de biopelículas en aislamientos clínicos de *C. metapsilosis*. Las barras representan la desviación estándar.

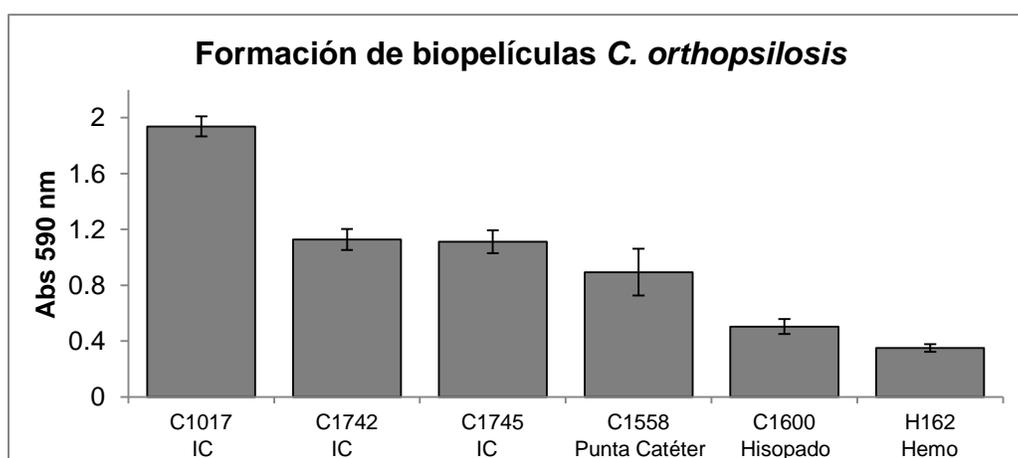


Figura 10. Cuantificación de producción de biopelículas en aislamientos clínicos de *C. orthopsilosis*. Las barras representan la desviación estándar.

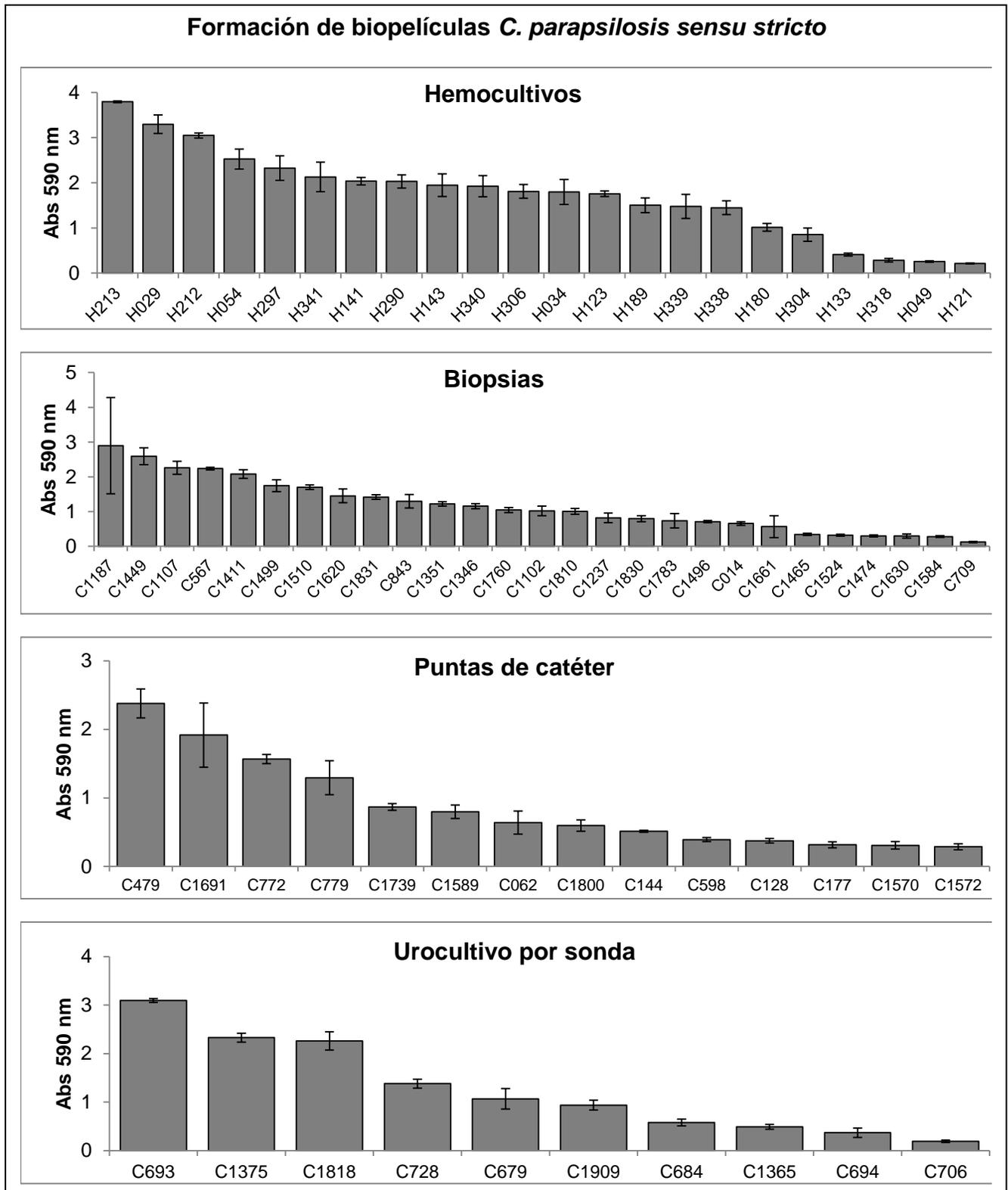


Figura 11. Cuantificación de producción de biopelículas en aislamientos clínicos de *C. parapsilosis sensu stricto* por tipo de muestra. Las barras representan la desviación estándar.

La medición de las biopelículas por cristal violeta para las especies del complejo *C. parapsilosis* se presenta en la **Figura 12**. La media de la medición de absorbencia a 590 nm para cada una de la especies fue la siguiente: *C. parapsilosis sensu stricto*, 1.200 (DE \pm 0.930) con intervalo de 0.040-3.795; *C. metapsilosis*, 0.571 (DE \pm 0.497) con intervalo de 0.126-1.423 y *C. orthopsilosis*, 0.987 (DE \pm 0.563) con intervalo de 0.504-1.937. *C. parapsilosis sensu stricto* es la especie del complejo que produce mayor biopelícula, seguida por *C. orthopsilosis* y por último *C. metapsilosis*. La diferencia entre los tres grupos del complejo *C. parapsilosis* no fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$ por análisis de varianza [ANOVA]).

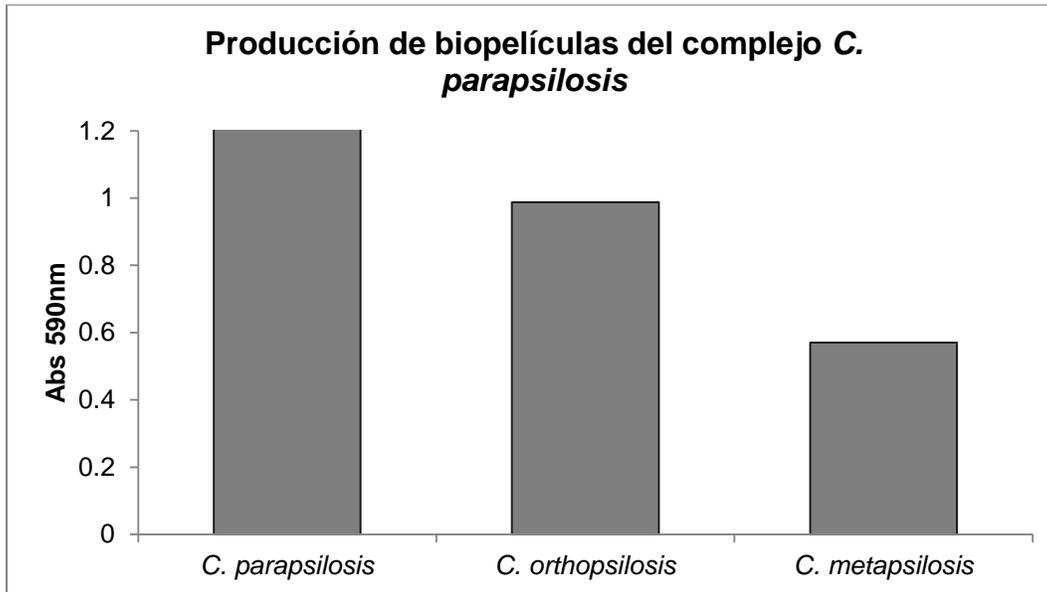


Figura 12. Cuantificación de producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*.

5.6 Susceptibilidad a anfotericina B y voriconazol de los miembros del complejo *Candida parapsilosis*

En la **Figura 13** se presentan dos placas dónde se evalúa el crecimiento de las levaduras a las diferentes concentraciones de los antifúngicos, la primera con el antifúngico anfotericina B y la segunda con voriconazol. La MIC se leyó en el pozo en el que el antifúngico inhibe el crecimiento de la cepa al 100 %.

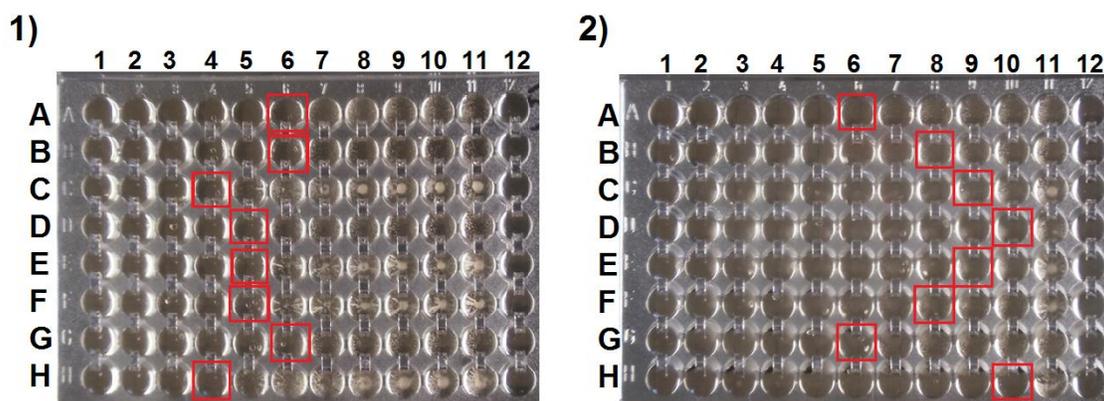


Figura 13. Concentraciones mínimas inhibitorias por microdilución en caldo. **1)** Evaluación de susceptibilidad a anfotericina B. MIC: Cepa A: 0.5, Cepa B: 0.5, Cepa C: 2, Cepa D: 1, Cepa E: 1, Cepa F: 1, Cepa G: 0.5, Cepa H: 2 [µg/mL]. **2)** Evaluación de susceptibilidad a voriconazol. MIC: Cepa A: 0.5, Cepa B: 0.125, Cepa C: 0.0625, Cepa D: <0.0312, Cepa E: 0.0625, Cepa F: 0.125, Cepa G: 0.5, Cepa H: <0.0312 [µg/mL]. Columna 1-10 concentración de antifúngico de 16-0.0312 µg/MI. Columna 11: control de crecimiento. Columna 12: control de esterilidad.

El valor de MIC₅₀ ayuda a determinar la MIC que representa a las cepas *wild type*, mientras que la MIC₉₀ representa aquellas que pueden presentar diferentes tipos de resistencia, lo que permite que sus valores de MIC sean elevados.⁵⁰

La **Tabla 2** presenta los valores de MIC₅₀, MIC₉₀ y el intervalo de MIC para cada una de las especies del complejo, así como el porcentaje de las especies sensibles y resistentes para voriconazol, y *wild type* (WT) o *non-wild type* (nWT) para anfotericina B. Mientras que la **Tabla 3** presenta específicamente los valores

de MIC de las cepas que resultaron resistentes para voriconazol y/o nWT para anfotericina B.

La MIC₅₀ fue la misma para el complejo *C. parapsilosis*, para anfotericina B es de 1 µg/mL y para voriconazol de 0.125 µg/mL. (**Tabla 2**)

La MIC₉₀ de las tres especies del complejo para anfotericina B fue de 2 µg/mL, mientras que para voriconazol la MIC₉₀ fue muy diferente para las tres especies: 4 µg/mL para *C. parapsilosis sensu stricto*, 2 µg/mL para *C. orthopsilosis* y >16 µg/mL para *C. metapsilosis*. (**Tabla 2**)

Las tres especies del complejo presentan altos porcentajes de resistencia para los dos antifúngicos evaluados: alrededor del 25-50 %. La mayoría de los aislados resistentes a anfotericina B tienen una MIC de 2 µg/mL, sólo el aislado C843 y C 273, identificados como *C. parapsilosis sensu stricto*, presentan una MIC elevada: 16 µg/mL. Para voriconazol muchos de los aislados resistentes tienen una MIC de 16 µg/mL, de los cuales 12 se identificaron como *C. parapsilosis sensu stricto* (C843, C1584, HO29, C1371, C1381, C1421, C780, C1212, C720, C1552, C1375, C679), uno como *C. orthopsilosis* (C1558) y tres como *C. metapsilosis* (C1563, C1588, C1654). (**Tabla 3**)

Para anfotericina B la diferencia en la susceptibilidad entre los tres grupos del complejo *C. parapsilosis* no fue estadísticamente significativa (P<0.05 por análisis de varianza [ANOVA]) Para voriconazol si fue significativa, *C. metapsilosis* VS *C. parapsilosis sensu stricto* (P<0.05 por análisis de varianza [ANOVA]-Fisher).

Tabla 2. Valores de MIC y susceptibilidad antifúngica a anfotericina B y voriconazol de los miembros del complejo *C. parapsilosis*.

Antifúngico	Especie	Rango de MIC (µg/mL)	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	WT (%)	nWT (%)
Anfotericina B	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	0.5 - >16	1	2	68.0	32.0
	<i>C. metapsilosis</i>	0.5 – 2	1	2	50.0	50.0
	<i>C. orthopsilosis</i>	0.5 – 2	1	2	50.0	50.0
Antifúngico	Especie	Rango de MIC (µg/mL)	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	S%	R%
Voriconazol	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	<0.0312 - >16	0.125	4	73.2	26.8
	<i>C. metapsilosis</i>	<0.0312 - >16	0.125	>16	62.5	37.5
	<i>C. orthopsilosis</i>	<0.0312 - >16	0.125	2	66.7	33.3

MIC₅₀: mínima concentración inhibitoria en la que 50% de los aislados son inhibidos. MIC₉₀: mínima concentración inhibitoria en la que 90% de los aislados son inhibidos. S: sensible. R: resistente. WT: *wild type*. nWT: *no-wild type*

Tabla 3. Aislados resistentes a voriconazol y/o nWT para anfotericina B.

	Cepa	VOR	ANFB		Cepa	VOR	ANFB		Cepa	VOR	ANFB	
		MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)			MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)			MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	C1496	0.0625	2	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	C1814	0.0312	2	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	C465	0.0625	2	
	C843	16	16		C1371	16	0.5		C419	0.0625	2	
	C1524	1	1		C1681	1	1		C720	16	1	
	C1870	0.0625	2		C1381	16	1		C471	0.0312	2	
	C1630	1	1		C080	0.25	2		C367	0.0312	2	
	C1584	16	2		C1705	1	2		C459	0.125	2	
	C1620	1	1		C1828	0.0312	2		C486	0.25	2	
	C1830	2	4		C1846	0.0625	2		C128	0.0312	2	
	C1449	0.125	2		C249	0.0625	4		C1570	1	2	
	C1760	2	2		C1323	0.125	2		C1800	0.0312	2	
	C1810	1	2		C227	0.125	2		C1739	2	2	
	C1465	2	2		C273	0.0312	16		C598	0.0312	4	
	C1474	2	4		C1871	0.25	2		C1572	16	2	
	C1499	2	2		C1823	0.125	2		C1818	0.125	2	
	C1783	0.125	2		C1749	2	2		C1909	1	2	
	C1510	4	2		C1743	0.0312	2		C1375	16	2	
	C014	0.0312	2		C087	0.0625	2		C679	16	2	
	C1831	0.0625	2		C1406	1	1		C1187	0.125	2	
	C1715	1	2		C1716	1	1		<i>C. orthopsilosis</i>	C1742	0.0312	2
	H029	16	0.5		C1421	16	1			C1745	2	2
H290	8	0.5	C1412	1	2	C1558	16	2				
H297	4	1	C1679	1	2	<i>C. metapsilosis</i>	C1511	0.125	2			
H339	2	0.5	C1393	1	1		C1563	16	2			
H338	4	1	C1680	2	1		C1588	16	2			
H340	4	1	C780	16	1		C1654	16	2			
H306	4	1	C1212	16	1							

VOR: Voriconazol. ANFB: Anfotericina B.

6. DISCUSIÓN

El tamaño del amplicón de la PCR punto final del gen que codifica para MnSOD depende de la especie del complejo: para *C. parapsilosis sensu stricto* el fragmento es de 171 pb, para *C. metapsilosis* de 250 pb y de 235 pb para *C. orthopsilosis*. Los amplicones de 171 pb, como los carriles 1, 2, 3 y 6 en la **figura 6**, se identifican como *C. parapsilosis sensu stricto*. La amplificación de estos aislados arroja una sola banda en el gel, esto nos indica que los oligonucleótidos son específicos para la amplificación del gen que codifica para la MnSOD del complejo de *C. parapsilosis*, ya que se realizó PCR a *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258 y la amplificación fue en distintos pesos moleculares.

La identificación de subespecie de los aislados que presentan bandas entre 200 y 250 pb se dificulta, esto debido a que los tamaños del amplicón que pertenece a *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* son cercanos. Para discernir entre estas dos especies se realizó digestión enzimática con Styl, aquellos amplicones en los que hubo digestión enzimática (165 y 70 pb) corresponden a *C. orthopsilosis*; la digestión enzimática pudo corroborarse ubicando dos bandas en el gel de agarosa después de la incubación con la enzima Styl. Aquellos amplicones cercanos a 250 pb que se les realizó digestión y no hubo corte se identificaron como *C. metapsilosis*.

Como se esperaba, *C. parapsilosis sensu stricto* es la especie predominante del complejo. Esta subespecie representa el 91.6 % de las infecciones en el INR. Por su parte, *C. metapsilosis* es la segunda más aislada (4.8 %) y por último se encuentra *C. orthopsilosis* (3.6 %).

La frecuencia de las especies del complejo depende de la variación geográfica. Ziccardi, *et al.*, publicaron en 2015 una recopilación de la frecuencia de las especies del complejo *C. parapsilosis* en diferentes estudios alrededor del mundo. De forma global reportó los siguientes porcentajes: *C. parapsilosis* 88.5 %, *C. orthopsilosis* 7.3 % y *C. metapsilosis* 4.2 %. Específicamente en México, estos

autores, citaron dos estudios: el de Treviño de 2012 y el de González de 2013. El primero reportó *C. parapsilosis* 90.4 %, *C. orthopsilosis* 8.4 % y *C. metapsilosis* 1.2 %; y el segundo *C. parapsilosis* 95.3 %, *C. orthopsilosis* 3.1 % y *C. metapsilosis* 1.6 %.³⁶

Estos datos muestran claramente que *C. parapsilosis sensu stricto* representa aproximadamente el 90 % del complejo, mientras que la frecuencia de las otras dos especies varía, sin embargo, *C. metapsilosis* es la menos frecuente. Al comparar con lo obtenido en este estudio, los resultados sugieren un cambio en la frecuencia del complejo *C. parapsilosis* particularmente en el INR, pues a diferencia de los estudios citados, en el INR hubo un porcentaje mayor de *C. metapsilosis* que *C. orthopsilosis*.

La formación de biopelículas es el mayor factor de virulencia para las especies del complejo *C. parapsilosis*.²⁶ Los resultados muestran que las tres especies del complejo *C. parapsilosis* son capaces de formar biopelículas, cada grupo presenta cepas altamente productoras de biopelícula y otras con baja formación de la biopelícula, esto indica que la producción de biopelícula no depende del tipo de muestra o la subespecie de la que pertenece el aislado. En la **Figura 12** se observa que, por el ensayo con cristal violeta, *C. parapsilosis sensu stricto* es la mayor productora de biopelícula, seguida por *C. orthopsilosis* y al último por *C. metapsilosis*, aunque estadísticamente los resultados no son significativos. Esto concuerda con lo reportado por Treviño *et al.* (2015) y Melo *et al.* (2011).^{23, 51} No obstante, estos resultados contrastan con lo reportado por Toro *et al.* (2010) y Tosun *et al.* (2013), ya que estos autores reportaron que sólo *C. parapsilosis sensu stricto* es capaz de formar biopelículas.^{20, 35}

Estas variaciones en los resultados pueden deberse a la diversidad de las técnicas empleadas para la producción de biopelícula: algunos autores utilizan la placa de 96 pozos de poliestireno, mientras que otros usan elastómero de silicona. De igual modo, las variaciones pueden corresponder a la elección de la técnica para la medición de la biopelícula, pues algunos autores utilizan la de cristal violeta y otros XTT. En este punto, Treviño *et al.*, Kuhn *et al.* y Melo *et al.* reportaron que no hay

correlación con los resultados obtenidos entre el estudio de CV y XTT, demostraron que las mediciones con XTT son insuficientes para cuantificar la biopelícula, siendo el ensayo con CV el más conveniente porque evalúa toda la biomasa.^{23, 44, 51}

No obstante, el factor más importante que influye en los resultados es la definición de la medición de la biopelícula, es decir, no existen puntos de corte para determinar si un aislado del complejo *C. parapsilosis* es productor de biopelícula y en qué grado, por ejemplo para *Staphylococcus aureus* existen puntos de corte para poder clasificar a la cepa como productora débil hasta hiperproductora de biopelícula.

En los estudios de susceptibilidad *in vitro* para *C. parapsilosis* se han reportado bajas frecuencias de resistencia para los antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, flucitosina, 2-3 %, 0-4.6 %, 1.5 %, 1.9 %, 2-6.4 % respectivamente. También se ha mostrado que existe resistencia cruzada entre los azoles.¹

En los resultados obtenidos, los miembros del complejo *C. parapsilosis* presentaron alta resistencia para anfotericina B y voriconazol de 26 % a 50 %, en contraste con lo citado por diversos autores. Toro *et al.* reportaron que ninguno de los aislados del complejo *C. parapsilosis* analizados mostraron resistencia a anfotericina B y voriconazol.²⁰ Por su parte, Tosun *et al.* reportaron algo similar: las tres subespecies fueron susceptibles para voriconazol.³⁵

Szabo *et al.* Y Chun-Chen *et al.* no mostraron el porcentaje de cepas resistentes en sus estudios, sin embargo los intervalos de MIC en sus resultados son muy bajos para las tres subespecies, es decir, tampoco reportan resistencia a anfotericina B y voriconazol.^{52, 53} Por otra parte Ziccardi *et al.* reportaron que para *C. parapsilosis sensu stricto* solo el 4.7% fue resistente a anfotericina B y voriconazol, lo cual es extremadamente distinto a lo encontrado en este estudio.³⁶

Posiblemente los resultados obtenidos dependen directamente de la zona geográfica y del tipo de paciente del que provienen los aislados, en estudio estas

características son las siguientes: Ciudad de México, aislados de pacientes con quemaduras o infecciones osteoarticulares. Treviño y colaboradores han sido los únicos en reportar sensibilidad en las especies del complejo *C. parapsilosis* en Monterrey, México, pues sólo reportaron resistencia por parte de *C. parapsilosis sensu stricto* para fluconazol (4.5 %), caspofungina (1.0 %), anidulafungina (5.1 % y para micafungina (3.2 %). Desafortunadamente no evaluaron la susceptibilidad a anfotericina B y voriconazol, pero sí es notorio que los porcentajes de resistencia son muy bajos, y en el caso de *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* no existe resistencia.⁵⁴

Otro factor es lo que se denomina *trailing growth*, un fenómeno que ocurre en la determinación de MIC en los azoles debido a su acción fungiestática, consiste en que la lectura de MIC a 24 horas da como resultado una cepa sensible, sin embargo, la lectura a 48 horas revela que realmente es resistente. Muchos de los autores citados sólo realizan la lectura a 24h, por lo que puede haber un sesgo en sus resultados.⁹

Es importante identificar los mecanismos moleculares que desarrollan las cepas que adquieren resistencia a un fármaco. En *C. albicans* se han reportado los siguientes mecanismo de resistencia a azoles: alteración en bombas de eflujo para favorecer la salida del antifúngico de la célula, alteraciones en la enzima diana Erg11p (mutaciones puntuales o sobreexpresión) o de enzimas involucradas en la biosíntesis de ergosterol. Existen dos familias de bombas de eflujo: las bombas de *ATP-binding cassette* (ABC) y transportadores MFS (*major facilitator superfamily*); un ejemplo de resistencia a azoles es la sobreexpresión de genes *CDR1* y *CDR2* (tipo ABC) y el gen *MDR1* (tipo MFS).^{9,55-58} La sobreexpresión de *CDR1* y *CDR2* es debido a la mutación en el factor de transcripción *TAC1*, mientras que la sobreexpresión de *MDR1* se debe a mutaciones en el factor de transcripción *MRR1*.⁵⁸

Son pocos los mecanismos de resistencia que se han descrito para *C. parapsilosis*. Silva et-al, descubrieron que en aislados de *C. parapsilosis*

resistentes a fluconazol y voriconazol, presentan sobreexpresión del factor de transcripción *MRR1* causada por dos mutaciones de ganancia de función: G1747A y A2619C, que resulta en cambio de aminoácido G583R (glicina a arginina) y K873N (lisina a asparagina) respectivamente. La sobreexpresión de *MRR1* conlleva a la sobreexpresión de la bomba de eflujo MDR1, lo que genera la resistencia.⁵⁶

El gen *ERG3* codifica para la enzima C-5 esteroil desaturasa que convierte los intermediarios no tóxicos 14 α -metilados en el esteroil tóxico 14 α -metil-ergosta-8,24 (28)-dien-3,6-diol durante la biosíntesis de ergosterol. Jeffrey y colaboradores reportaron que una mutación homocigota no silenciosa en el gen *ERG3*, que genera la sustitución de glicina por arginina en la posición 111, es la responsable de la resistencia a azoles en un aislado de *C. parapsilosis*.⁵⁷ Branco y colaboradores presentan algo similar, una mutación sin sentido en el gen *ERG3*, que genera un cambio de arginina a isoleucina en la posición 135, es la causante de la resistencia a azoles para aislados de *C. parapsilosis*.⁵⁵ Ambas mutaciones inactivan la actividad de Erg3, lo que resulta en la pérdida de ergosterol en la membrana, pero en la acumulación de un intermediario no tóxico (ergosta-7, 22-dienol), que es lo que permite los altos niveles de resistencia a azoles.^{55, 57}

El factor de transcripción Upc2 es el mayor regulador del metabolismo de esteroil y controla la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de ergosterol. En diferentes estudios, en aislados de *C. parapsilosis* resistentes a azoles se ha detectado una sobreexpresión de *UPC2* lo que resulta en regulación a la alta (*up regulation*) de diversos genes involucrados en la biosíntesis de ergosterol como *ERG6*, *ERG11* y otros genes *ERG*.^{55, 56, 57}

En *C. albicans* la pérdida de ergosterol en la membrana resulta en la resistencia a anfotericina B, sin embargo para *C. parapsilosis* no se ha observado que se modifique la susceptibilidad por pérdida de ergosterol.⁵⁷

La resistencia a azoles y anfotericina B en aislados de *C. parapsilosis* es compleja y será importante establecer los mecanismos de resistencia que expresan los aislados resistentes de *C. parapsilosis* de este estudio.

La MIC₉₀ de las tres subespecies es igual para anfotericina B, no hay diferencias significativas en el complejo con respecto a este antifúngico. Tosun *et al.* reportaron algo similar, al encontrar que la MIC de anfotericina B para *C. parapsilosis sensu stricto* es mayor a lo que presentan las otras subespecies del complejo, pero sin diferencias significativas, no obstante, ninguno de los autores se atreve a confirmar que sus resultados sean confiables por el poco número de aislados evaluados.³⁵

Para voriconazol la MIC₉₀ es diferente: para *C. metapsilosis* presenta la mayor MIC de las tres especies (>16 µg/mL), seguida por *C. parapsilosis sensu stricto* (4 µg/mL) y, por último, *C. orthopsilosis* (2 µg/mL). Estadísticamente sólo se encontraron diferencias entre *C. metapsilosis* y *C. parapsilosis*, siendo *C. metapsilosis* la que presenta mayores valores de MIC. Esto concuerda con lo descrito por Chun-Chen *et al.*, quienes demostraron que *C. metapsilosis* tiene MIC de voriconazol mayores a los que presentan *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*.⁵³ Por otra parte, Ziccardi *et al.* demostraron estadísticamente que no existen diferencias en las MIC para voriconazol entre el complejo *C. parapsilosis*.³⁶

7. CONCLUSIONES

Se logró realizar la diferenciación de las especies del complejo *C. parapsilosis* mediante amplificación parcial del gen *MnSOD* y posterior digestión enzimática con Styl.

Se identificó *C. parapsilosis sensu stricto* como la especie predominante del complejo, seguida por *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* en las cepas identificadas como complejo *C. parapsilosis* en el período de junio 2011 a agosto 2016.

La producción de biopelículas fue visible en las tres especies del complejo y no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Sin embargo, se identificaron cepas que tienen la capacidad de producir biopelícula en mayor proporción que otras. Será importante estudiarlas para conocer los genes o mecanismos implicados en la producción alta de biofilm.

La susceptibilidad en los aislados del complejo *C. parapsilosis* es diferente a lo reportado, en general las tres especies tienen porcentajes de resistencia alrededor de 30 % a anfotericina B y voriconazol. En este estudio para los miembros del complejo *C. parapsilosis* no existe diferencia en la susceptibilidad a anfotericina B, aunque sí para el antifúngico voriconazol.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Trofa, D.; Gácser, A.; Nosanchuk, J. Candida parapsilosis, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical microbiology Reviews*. **2008**, 21 (4), 606-625.
2. Xiaobo, F.; Zengbin, W.; Bo, L.; Shuming, P.; Wanqing, L.; Welhua, P.; Zhrlong, Y. Identification and Differentiation of Candida parapsilosis Complex Species by Use of Exon-Primed Intron-Crossing PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **2014**, 52, 1758-1761.
3. Bertini, A.; Bernardis, F.; Hensgens, L.; Sandini, S.; Senesi, S.; Tavanti, A. Comparison of Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis adhesive properties and pathogenicity. *International Journal of Medical Microbiology*. **2013**, 303, 98-103.
4. Bonifaz A. *Micología médica básica*, 4a ed.; Mc Graw Hill: México, 2012.
5. National Center for Biotechnology Information, PubMed Health. Candidiasis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0024526> (Consultado Febrero 6, 2017).
6. Binelli, A.; Moretti, M.; Assis, R.; Sauaia, N.; Menezes, P.; Ribeiro, E.; Geiger, D.; Mikami, Y.; Miyaji, M.; Oliveira, M.; Barone, A.; Levin, A. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. *Clinical Microbiology and Infection*. **2006**, 12 (6), 538-543.
7. McManus, B.; Coleman, D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Candida albicans. *Infection, Genetics and Evolution*. **2014**, 21, 166-178.
8. National Center for Biotechnology Information, Taxonomy. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5480>. (Consultado Febrero 10, 2017).
9. Heitman, J.; Filler, S. G.; Edwards, J. E.; Mitchell, A. P. Toward a Molecular Understanding of Candida albicans virulence. In *Molecular principles of fungal pathogenesis*; ASM Press: Washington, 2006; Vol. 22; p 305-310.
10. Murray, P.; Baron, E.; Jorgensen, J.; Landry, M.; Pfaller, M. *Manual of Clinical Microbiology*, Novena edición; ASM Press: Washington, 2007.

11. Silva, S.; Negri, M.; Henriques, M.; Oliveira, R.; Williams, D. y Azeredo, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 288-305.
12. Bicmen, C.; Doluca, M.; Gulat, S.; Gunduz, A.; Tuksavul, F. Species level identification and antifungal susceptibility of yeast isolate from various clinical specimens and evaluation of Integral System Yeasts Plus. *New Microbiologica.* **2012**, *35*, 327-334.
13. Ing-Moi, H.; Hii-Lan, C.; Li-Chen, L.; Yu-Lin, L.; Yuag_meng, L.; Chun-Eng, L.; Chang-Hua, C.; Yu-Ren, C. y Chih-Yen, C. Changing epidemiology of candidemia in a medical center in middle Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* **2015**, *48*, 306-315.
14. Pemán, J. y Salavert, M. Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* **2013**, *31*, 328-341.
15. Eliakim-Raz, N.; Babaoff, R.; Yahav, D.; Yanai, S.; Shaked, H.; Bishara, J. Epidemiology, microbiology, clinical characteristics, and outcomes of candidemia in internal medicine wards-a retrospective study. *International Journal of Infectious Diseases.* **2016**, *52*, 49-54.
16. Kaur, R.; Dhakad, M.; Goyal, R.; Kumar, R. Emergence of non-albicans *Candida* species and antifungal resistance in intensive care unit patients. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* **2016**, *6*, 455-460.
17. Quindós, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana de Micología.* **2014**, *1*, 42-48.
18. Corzo-Leon, D. E.; Alvarado-Matute, T.; Colombo, A. L.; Cornejo-Juarez, P.; Cortes, J.; Echevarria, J. I.; Guzman-Blanco, M.; Macias, A. E.; Nucci, M.; Ostrosky-Zeichner, L.; Ponce-de-Leon, A.; Queiroz-Telles, F.; Santolaya, M. E.; Thompson-Moya, L.; Tiraboschi, I. N.; Zurita, J.; Sifuentes-Osornio, J. Surveillance of *Candida* spp Bloodstream Infections: Epidemiological Trends and Risk Factors of Death in Two Mexican Tertiary Care Hospitals. *PLOS one.* **2014**, *9* (5), e97325.

19. Rocha, T.; Cordeiro, R.; Bruder-Nascimento, A.; Scheel, C.; Bagagli, E. Analysis of Inteins in the *Candida parapsilosis* Complex for Simple and Accurate Species Identification. *Journal of Clinical Microbiology*. **2013**, *51*, 2830-2836.
20. Toro, M.; Torres, M.; Ruíz, M.; Aznar, J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. **2011**, *17*, 419-424.
21. Tavanti, A.; Davidson, A.; Gow, N.; Maiden, M.; Odds, C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. Nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*. **2005**, *43*, 284-292.
22. Vercher, M.; García, J.; Cantón, E.; Pemán, J.; Gómez, M.; Valentín, E.; del Castillo, L. Differentiation of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* by specific PCR amplification of the RPS0 intron. *International Journal of Medical Microbiology*. **2011**, *301*, 531-535.
23. Treviño, R.; Rodríguez, I.; Rosas, A.; Hernández, R.; González, J.; González, G. Biofilm formation and genetic variability of BCR1 gene in the *Candida parapsilosis* complex. *Revista Iberoamericana de Micología*. **2015**, *32*, 180-184.
24. Almeida, J.; Bonato, L.; Lopes, A.; Rossi, F.; Romano, T.; Benard, G.; Barbaro, G. Evaluation of the MALDI-TOF VITEK MSTM system for the identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* from bloodstream infections. *Journal of Microbiological Methods*. **2014**, *105*, 105-108.
25. Kuhn, D.; Chandra, J.; Mukherjee, P.; Ghannoum, A. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. *Infection and Immunity*. **2002**, *80*, 878-888.
26. Pannanusorn, S.; Ramírez, B.; Lünsdorf, H.; Agerberth, B.; Morschhäuser, J.; Römling, U. Characterization of Biofilm Formation and the Role of BCR1 in Clinical Isolates of *Candida parapsilosis*. *Eukaryotic Cell*. **2014**, *13*, 438-451.

27. Renau, A.; García, C.; Salavert, M. Enfermedades invasivas por hongos levaduriformes en pacientes quemados graves. *Revista Iberoamericana de Micología*. **2016**, *33*, 160-169.
28. Vinsonneau, C.; Benyamina, M.; Baixench, M.; Stephanazzi, J.; Augris, C.; Grabar, S.; Paugam, A.; Wassermann, D. Effects of candidaemia on outcome of burns. *Burns*. **2009**, *35*, 561-564.
29. Miller, A.; Gamaletsou, M.; Henry, M.; Al-Hafez, L.; Hussain, K.; Sipsas, N.; Kontoyiannis, D.; Roilides, E.; Brause, B.; Walsh, T. Successful treatment of Candida osteoarticular infections with limited duration of antifungal therapy and orthopedic surgical intervention. *Infectious Diseases*. **2015**, *47*, 144-149.
30. Neofytos, D.; Huprikar, S.; Reboli, A.; Schuster, M.; Azie, N.; Franks, B.; Horn, D. Treatment and outcomes of Candida osteomyelitis: review of 53 cases from the PATG Alliance® registry. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **2014**, *33*, 135-141.
31. Teixeira, D.; da Silva, S.; Wanke, B.; da Silva, J.; Cordeiro, M.; Santana, K.; Lins, R.; Nocker, A.; Braga, J. PCR-RFLP as a useful tool for diagnosis of invasive mycoses in a healthcare facility in the North of Brazil. *Electronic Journal of Biotechnology*. **2015**, *18*, 231-235.
32. Tawi, F. Advantages and limitations of potential methods for the analysis of bacteria in milk: a review. *J Food Sci Technol*. **2016**, *53*, 42-49.
33. National Center for Biotechnology Information, Probe. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrapd/> (Consultado Abril 4, 2017).
34. Fréalle, E.; Noël, C.; Nolard, N.; Symoens, F.; Felipe, M.; Dei, E.; Camus, D.; Viscogliosi, E.; Delhaes, L. Manganese superoxide dismutase based phylogeny of pathogenic fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **2006**, *41*, 28-39.
35. Tosun, I.; Akyuz, Z.; Cebeci, N.; Gulmez, D.; Bayramoglu, G.; Kaklikkaya, N.; Arıkan-Akdagli, S.; Aydin, F. Distribution, virulence attributes and

- antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. *Medical Mycology*. **2013**, *51*, 483-492.
36. Ziccardi, M.; Souza, L.; Gandra, R.; Galdino, A.; Baptista, A.; Nunes, A.; Ribeiro, M.; Branquinha, M.; Santos, A. *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. *International Journal of Medical Microbiology*. **2015**, *305*, 848-859.
37. Gácsér, A.; Schäfer, W.; Nosanchuk, J. S.; Salomon, S.; Nosanchuk, J. D. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genetics and Biology*. **2007**, *44*, 1336-1341.
38. Francesca, C.; Colombari, B.; Blasi, E. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the *C. parapsilosis* complex. *Medical Mycology*. **2010**, *48*, 1024-1033.
39. Horkáa, M.; Ruzicka, F.; Kubesoová, A.; Nemcovád, E.; Slais, K. Separation of phenotypically indistinguishable *Candida* species, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. parapsilosis*, by capillary electromigration techniques. *Journal of Chromatography A*. **2011**, *1218*, 3900-3907.
40. Donlan, R. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. **2002**, *8*, 881-890.
41. Holland, L.; Schröder, M.; Turner, S.; Taff, H.; Andes, D.; Grózer, Z.; Gácsér, A.; Ames, L.; Haynes, K.; Higgins, D.; Butler, G. Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *Pathogens*. **2014**, *10*, 1-18.
42. Araújo, D.; Henriques, M.; Silva, S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. *Trends in Microbiology. Review*. **2016**, 1-14.
43. Pereira, L.; Silva, S.; Ribeiro, B.; Henriques, M.; Azeredo, J. Influence of glucose concentration on the structure and quantity of biofilms formed by *Candida parapsilosis*. *FEMS Yeast Research*. **2015**, *15*, 1-7.

44. Kuhn, D.; Blakis, M.; Chandra, J.; Mukherjee, P.; Ghannoum, M. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of Candida Growth and Metabolism. *Journal of Clinical Microbiology*. **2003**, *41*, 506-508.
45. Abdul, A.; Mukherjee, P.; Chandra, J.; Swindell, K.; Lockhart, S.; Diekema, D.; Pfaller, M.; Ghannoum, M. Characterization of biofilms formed by Candida parapsilosis, C. metapsilosis, C. orthopsilosis. *International Journal of Medical Microbiology*. **2010**, *300*, 265-270.
46. Kotaczewska, A. and Kotaczewski, M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans Candida species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2016**, *71*, 1438-1450.
47. Albatineh, M. T.; Sutton, D. A.; Fothergill, A. W.; Wiederhold, N. P. Update from the Laboratory Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. *Infect Dis Clin N Am*. **2016**, *30*, 13-25.
48. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd ed., approved standard M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
49. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 4th suppl., M27-S4 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
50. Turnidge, J.; Kahlmeter, G.; Kronvall, G. Statistical characterization of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination on epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect*. **2006**, *12*, 418-425.
51. Melo, A.; Bizerra, F.; Freymüller, E.; Arthington, B.; Colombo, A. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical Candida spp. Isolates, including strains of the candida parapsilosis complex. *Medical Mycology*. **2011**, *49*, 253-262.
52. Szabo, Z.; Szilágyi, J.; Tavanti, A.; Kardos, G.; Rozgonyi, F.; Bayegan, S.; Majoros, L. In vitro efficacy of 5 antifungal agents against Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis as

- determined by time-kill methodology. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **2009**, *64*, 283-288.
53. Chen, Y.; Lin, Y.; Chen, K.; Lii, J.; Teng, H.; Li, S. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **2010**, *68*, 284-292.
54. Treviño, R.; Garza, E.; González, G.; Bocanegra, V.; Llaca, J.; González, G.M. Molecular characterization and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis* species complex of clinical isolates from Monterrey, Mexico. *Medical Mycology*. **2012**, *50*, 781-784.(51)
55. Branco J.; Ola, M.; Silva, R. M.; Fonseca, E.; Gomes, N. C.; Martins-Cruz, C.; Silva, A. P.; Silva-Dias, A.; Pina-Vaz, C.; Erraught, C.; Brennan, L.; Rodrigues, A. G.; Butler, G.; Miranda, I. M. Impact of *ERG3* mutations and expression of ergosterol genes controlled by *UPC2* and *NDT80* in *Candida parapsilosis* azole resistance, *Clinical Microbiology and Infection*. **2017**, doi: 10.1016/j.cmi.2017.02.002.
56. Silva, A. P.; Miranda, I. M.; Guida, A.; Synnott, J.; Rocha, R.; Silva, R.; Amorim, A.; Pina-Vaz, C.; Butler, G.; Rodrigues, A. G. Transcriptional Profiling of Azole-Resistant *Candida parapsilosis* Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2011**, *55*, 3546-3556.
57. Jeffrey, M.; Rybak, C.; Dickens, M.; Parker, J. E.; Caudle, K.; Manigaba, K.; Whaley, S. G.; Nishimoto, A.; Luna-Tapia, A.; Roy, S.; Zhang, Q.; Barker, K. S.; Palmer, G. E.; Sutter, T. R.; Homayouni, R.; Wiederhold, N. P.; Kelly, S. L. and Rogers, P. D. Loss of C-5 sterol desaturase activity results in increased resistance to azole and echinocandin antifungals in a clinical isolate of *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2017**, doi:10.1128/AAC.00651-17.
58. Berkow, E.L.; Manigaba, K.; Parker, J. E.; Barker, K. S.; Kelly, S. L.; Rogers, P. D. Multidrug Transporters and Alterations in Sterol Biosynthesis Contribute to Azole Antifungal Resistance in *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2015**, *59*, 5942-5950.