

## Artículo original

# Frecuencia y perfil de sensibilidad *in vitro* de aislamientos del Complejo *Candida parapsilosis* provenientes de pacientes con candidemias

Xiomara Moreno<sup>a,\*</sup>, Vera Reviákina<sup>b</sup>, María Mercedes Panizo<sup>b,\*</sup>, Giuseppe Ferrara<sup>b</sup>, Nataly García<sup>b</sup>, Víctor Alarcón<sup>b</sup>, Maribel Dolande<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología. Instituto Médico la Floresta. <sup>b</sup>Departamento de Micología. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas, Venezuela.

Recibido 6 de mayo de 2015; aceptado 28 de julio de 2015

**Resumen:** El objetivo de este trabajo fue conocer la frecuencia y el perfil de sensibilidad *in vitro* de aislamientos del Complejo *Candida parapsilosis* provenientes de casos de candidemias. Se estudiaron 754 cepas (Periodo 2008-2011), de la Red de Vigilancia de Candidemia del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". La identificación de las cepas se realizó por pruebas fenotípicas. La sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos se evaluó por el método de Etest® y se determinó la concentración mínima inhibitoria a anfotericina B (AB), caspofungina (CS), fluconazol (FZ), y voriconazol (VZ). Se calcularon los puntos de corte epidemiológicos (PCE) y los rangos de cepas salvajes (PS) para cada antifúngico. El 43,6% de las cepas (n=328) fueron identificadas como Complejo *C. parapsilosis*; todas fueron sensibles a AB y presentaron bajos porcentajes de resistencia a FZ (4,3%), VZ (1,2%) y CS (0,6%). Los PCE y los rangos de PS (en µg/mL) fueron: FZ: 2/0,03-2; VZ y AB: 0,06/0,002-0,06 y CS: 0,5/0,002-0,5 respectivamente. Los resultados de este estudio aportaron información importante sobre el comportamiento del Complejo *C. parapsilosis* frente a los antifúngicos más utilizados en el tratamiento de las candidemias.

**Palabras clave:** Complejo *Candida parapsilosis*, candidemia, antifúngicos, pruebas de sensibilidad *in vitro*, puntos de corte epidemiológico, cepas salvajes.

## Frequency and *in vitro* susceptibility profile of *Candida parapsilosis* Complex isolates from patients with candidemia

**Abstract:** The aim of this study was to determine the frequency and *in vitro* susceptibility profile of *Candida parapsilosis* Complex isolates from patients with candidemia. Seven hundred and fifty four (754) strains (Period 2008-2011), from the Candidemia Surveillance Network of the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" were studied. The strains identification was performed by phenotypic methods. *In vitro* antifungal susceptibility was evaluated by the Etest® method and minimum inhibitory concentration for amphotericin B (AB), caspofungin (CS), fluconazole (FZ), and voriconazole (VZ) was determined. Epidemiological cut off values (ECV) and ranges for wild type strains (WT) were also calculated for each antifungal. Forty three point six (43.6%) of the isolates (n=328) belonged to *C. parapsilosis* Complex; all of them were susceptible to AB and showed low resistance percentages to FZ (4.3%), VZ (1.2%) and CS (0.6%). The ECV and WT strains ranges (in mcg/mL) were: FZ: 2/0.03-2; VZ and AB: 0.06/0.002-0.06 and CS: 0.5/0.002-0.5 respectively. The results of this study provided important information about the behavior of the *C. parapsilosis* Complex against the most commonly antifungal agents used for the treatment of candidemias.

**Keywords:** *Candida parapsilosis* Complex, candidemia, antifungal agents, *in vitro* susceptibility testing, epidemiological cut off values, wild type strains.

\* Correspondencia:

E-mail: x.morenoc@hotmail.com; mmpanizo@gmail.com

### Introducción

*Candida albicans* es la causa más frecuente de infecciones fúngicas, pero con el advenimiento de los nuevos avances médicos y quirúrgicos en quimioterapia, radioterapia, el uso

de esteroides y catéteres, o el estado de inmunosupresión que presentan algunos pacientes, se ha observado que especies de *Candida* diferentes de *C. albicans* se están comportando como patógenos oportunistas de suma importancia clínica [1-4].

Entre las especies del género *Candida*, que están aumentando como agentes causales de candidemias en Australia, Latinoamérica, Canadá, Asia, África y Europa, se encuentra el Complejo *C. parapsilosis* [2-8]. Este complejo está formado en realidad por tres especies crípticas a nivel molecular: *Candida parapsilosis sensu stricto* (Grupo I), *Candida orthopsilosis* (Grupo II) y *Candida metapsilosis* (Grupo III) [1,9]. Diversos estudios han demostrado que son responsables de brotes de infecciones nosocomiales, donde las manos de los empleados de la salud, que están en contacto con los pacientes, son la fuente exógena predominante de estas patologías. Además, es el más frecuentemente aislado en infecciones del torrente sanguíneo, principalmente en neonatos, pacientes trasplantados, pacientes con inmunodeficiencias y aquellos que reciben nutrición parenteral [2-4].

En algunos casos, el Complejo *C. parapsilosis* ha superado a *C. albicans* como especie causal de candidemias, tal y como se ha reportado en algunos hospitales pediátricos, centros hospitalarios de tercer nivel, centros que atienden pacientes oncológicos y programas de vigilancia epidemiológica en diferentes regiones geográficas del mundo. Las infecciones del torrente sanguíneo causadas por este complejo tienen una tasa de mortalidad que oscila entre 4 a 45%, con un promedio de 28,5%, que se considera muy elevada [2,3,5-7,10-18].

Las claves para el manejo apropiado de las candidemias son realizar un diagnóstico clínico y microbiológico adecuado y el uso temprano de terapia antifúngica específica. Anfotericina B, caspofungina y fluconazol son los antifúngicos usados como primera línea en el tratamiento de la candidemia. Como alternativa terapéutica puede utilizarse el voriconazol [19,20].

Por estas razones, el objetivo de este trabajo fue conocer la frecuencia del Complejo *C. parapsilosis* causantes de candidemias en Venezuela, así como su perfil de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos más utilizados: anfotericina B, caspofungina, fluconazol y voriconazol.

## Materiales y métodos

Se diseñó un estudio experimental, descriptivo y de corte transversal para conocer la frecuencia de las especies de *Candida* provenientes de casos de candidemia y determinar su sensibilidad a los antifúngicos. Se utilizaron cepas aisladas de sangre, por lo que el desarrollo de este trabajo se llevó a cabo respetando los lineamientos referentes al procesamiento de muestras biológicas de origen humano, previa solicitud y consentimiento de los participantes. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Bioética de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda.

*Procedencia de las cepas:* Se estudiaron un total de 754 cepas provenientes de la Red de Vigilancia de Candidemia del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR), en la cual participan tanto instituciones públicas como privadas, con predominio

de las ubicadas en la región capital: Hospital Universitario de Caracas, Instituto Médico La Floresta, Centro Médico de Caracas, Clínica Santa Sofía, Centro Médico Loira, Hospital Dr. Domingo Luciani, Hospital de Clínicas Caracas, Hospital José María de Los Ríos, Maternidad Concepción Palacios, Laboratorio Clínico Galeno, Policlínica Metropolitana, Centro Médico Docente La Trinidad, Laboratorio Sánchez Font (Valencia, estado Carabobo) y Universidad de Oriente Núcleo Anzoátegui (Barcelona, estado Anzoátegui). Se utilizaron las cepas pertenecientes al periodo 2008-2011, las cuales se mantuvieron preservadas por el método de Castellani [21] hasta el momento de su procesamiento.

*Preparación de los aislamientos:* La recuperación de los aislamientos se realizó cultivándolos por 24 a 48 horas a 28 °C en agar glucosado de Sabouraud (SDA), verificándose su viabilidad y pureza. Posteriormente, se procedió a la confirmación taxonómica de las cepas mediante pruebas fenotípicas, como resistencia a la cicloheximida (agar Mycosel®, Oxoid), producción de pigmentos en agar cromógeno (Oxoid), visualización de la morfología microscópica en agar harina de maíz y pruebas fisiológicas con los sistemas Vitek-2 Compact® e ID 32C® (Biomerieux) [22].

*Estudio de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos:* Se procedió a la preparación de los inóculos de los aislamientos utilizando cuatro a cinco colonias aisladas en SDA que fueron suspendidas en solución salina estéril al 0,85% y ajustadas espectrofotométricamente a 0,5 McFarland en un densitómetro (Densimat™ bioMérieux) a 530 nm. Se usó el método de Etest® (AB Biomerieux) con modificaciones, usando placas con agar Müller Hinton suplementado con 2% de glucosa y azul de metileno y tiras de antifúngicos, siguiendo las instrucciones del fabricante [23,24]. Las placas fueron inoculadas utilizando hisopos embebidos en la suspensión del inóculo, se estiraron en tres direcciones, se dejaron secar por 15 min y posteriormente se colocaron tiras de fluconazol (FZ) (0,016-256 µg/mL), anfotericina B (AB), caspofungina (CS), y voriconazol (VZ) (0,002-32 µg/mL). Las placas se incubaron a 35 °C y la concentración mínima inhibitoria (CMI) se leyó a las 24 h, con un tiempo máximo de 48 h para aquellos casos en los que no pudo realizarse la lectura en el tiempo estipulado.

*Criterios de interpretación de la CMI:* La CMI fue interpretada como la menor concentración obtenida cuando los bordes de la elipse producida por la zona de inhibición se interceptaron con la escala de medición de la tira de antifúngicos. Para poder comparar las CMI obtenidas en este estudio con los valores establecidos en el documento M27-S4 del CLSI [25], los valores ubicados entre dos diluciones consecutivas fueron llevados a la dilución inmediatamente superior del método de referencia; los valores de CMI en el límite superior de la tira fueron llevados a la máxima concentración permitida y los valores en el límite inferior se mantuvieron sin cambios [23,24,26].

Los criterios de interpretación utilizados fueron susceptible (S), susceptible dosis dependiente (SDD), intermedio (I) y resistente (R), siguiendo los puntos de corte clínicos (PCC) establecidos en el mencionado documento en  $\mu\text{g/mL}$ . Para FZ: S:  $\leq 2$ ; SDD: 4; R:  $\geq 8$ . Para VZ: S:  $\leq 0,125$ ; SDD: 0,25-0,5; R:  $\geq 1$ . Para AB: S:  $\leq 1$ ; R:  $\geq 2$ . Para CS: S:  $\leq 2$ ; I: 4; R:  $\geq 8$ .

**Control de calidad:** Se utilizaron las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258.

**Análisis de los datos:** Se elaboró una base de datos en Excel 2010 y los datos se analizaron mediante porcentajes y medidas de tendencia central: porcentaje de sensibilidad, media geométrica (MG), moda (M), mediana (Me) y rangos de concentración para cada antifúngico. Para el análisis de la sensibilidad a los antifúngicos se calculó el percentil 50 (CMI<sub>50</sub>) y el percentil 90 (CMI<sub>90</sub>), que representan los valores de CMI que inhiben al 50 y 90% de los aislamientos, respectivamente.

Para analizar la distribución de las CMI de cada antifúngico se estimó la población salvaje (PS) y se determinaron los puntos de corte epidemiológicos (PCE). El PCE es el valor de la CMI obtenido después de tomar en consideración la M + 1 dilución del antifúngico verificando la reproducibilidad de las CMI, y se estima mediante la inspección visual de la distribución de los valores de CMI; generalmente, este valor corresponde a la CMI que define el límite superior de una población salvaje. La población salvaje se define como aquella que no alberga ningún mecanismo de resistencia natural o adquirida frente al antifúngico que se está evaluando. La CMI de una población salvaje se encuentra alrededor de 2 a 5 diluciones por debajo de la M y se categoriza aplicando los puntos de corte epidemiológicos [27-30].

La relación entre los valores de sensibilidad y resistencia entre fluconazol y voriconazol para el complejo se analizó mediante las tablas de contingencia y la prueba de Chi Cuadrado con corrección de Yates, utilizando el programa Statgraphics 5.0. Un valor de  $p \leq 0,05$  fue considerado significativo.

## Resultados

De las 754 cepas analizadas, 329 pertenecieron al Complejo *C. parapsilosis* (43,6%) y el 56,4% restante fueron 161 *C. tropicalis* (22%), 113 Complejo *C. albicans* (15%), 39 Complejo *C. glabrata* (5%), 31 *C. pelliculosa* (4%), 24 *C. guilliermondii* (3%), 15 Complejo *C. krusei* (2%), 4 *C. lusitanae* (1%), 4 *C. haemulonii* (1%), 4 *Trichosporon* spp. (1%), 3 *Wickerhamomyces anomalus* (0,4%), 2 *Rhodotorula mucilaginosa* (0,4%) y una de cada una de las siguientes levaduras: *R. minuta*, *Pichia etchellsii*, *C. utilis*, *Cryptococcus neoformans* y *C. lipolytica* (0,1% cada una, respectivamente). La información relativa a los datos demográficos y epidemiológicos de las cepas no se encontraba disponible.

Los resultados correspondientes a los cálculos de los rangos, MG, M, CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> y los porcentajes de S, SDD, I y R para cada antifúngico ensayado, se muestran en la tabla 1. Los valores de MG, M y CMI<sub>50</sub> para VZ y AB fueron similares; los valores de la CMI<sub>90</sub> se diferenciaron en una dilución. Tomando en cuenta los puntos de corte establecidos por el CLSI, todas las cepas del Complejo *C. parapsilosis* fueron sensibles a AB y presentaron bajos porcentajes de resistencia a los demás antifúngicos.

Tabla 1. Rangos, MG, M, CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub> y porcentajes de S, SDD y R del Complejo *Candida parapsilosis* a cuatro antifúngicos por el método de Etest® (n=328).

ATF	Rangos*	MG*	M*	CMI <sub>50</sub> *	CMI <sub>90</sub> *	n (%)		
						S	SDD	R
FZ	0,031 - $\geq 64$	1,008	1	1	2	305 (93)	9 (2,7)	14 (4,3)
VZ	$\leq 0,002$ - 4	0,036	0,03	0,03	0,125	319 (97)	6 (1,82)	3 (1,2)
AB	$\leq 0,002$ - 0,5	0,033	0,03	0,03	0,25	328 (100)		
CS	$\leq 0,002$ - $\geq 8$	0,239	0,25	0,25	0,5	326 (99,4)		2 (0,6)

ATF: Antifúngico; FZ: fluconazol; VZ: voriconazol; AB: anfotericina B; CS: Caspofungina; \*: todos los valores en  $\mu\text{g/mL}$ ; MG: media geométrica; M: moda; CMI<sub>50</sub>: concentración que inhibe el 50% de los aislamientos; CMI<sub>90</sub>: concentración que inhibe el 90% de los aislamientos; S: sensible; SDD: susceptible dosis dependiente; R: resistente.

Trescientas cinco (305) cepas fueron S a FZ y VZ (93%); 8 fueron SDD a FZ y S a VZ (2,4%); 1 cepa fue SDD a ambos antifúngicos (0,3%); 6 fueron R a FZ y S a VZ (1,8%); 5 fueron R a FZ y SDD a VZ (1,5%) y 3 fueron R a ambos antifúngicos, lo que implica la presencia de resistencia cruzada; la asociación entre los valores de S, SDD y R para FZ y VZ fue estadísticamente significativa con un 99% de confianza ( $p < 0,01$ ).

En la tabla 2 se muestran los perfiles de sensibilidad *in vitro* para los cuatro antifúngicos ensayados, los PCE y los rangos de PS. FZ agrupó el 43% de las cepas del complejo con el valor de la M (1  $\mu\text{g/mL}$ ) y el 85% alrededor de la M  $\pm 1$  dilución; VZ agrupó el 57% de las cepas con la M (0,03  $\mu\text{g/mL}$ ) y el 85% alrededor de la M  $\pm 1$  dilución; AB agrupó el 28% de las cepas al valor de la M (0,03  $\mu\text{g/mL}$ ) y 54% alrededor de la M  $\pm 1$  dilución; CS agrupó el 45% con el valor de la M (0,25  $\mu\text{g/mL}$ ) y 91% alrededor de la M  $\pm 1$  dilución.

El PCE de FZ coincidió con el punto de corte clínico para las cepas sensibles, abarcando el 93% de las mismas, mientras que los PCE de VZ, AB y CS están por debajo de los puntos de corte clínicos. Tomando en cuenta los PCE y los rangos de PS obtenidos en este estudio, el 7% de las cepas estaba fuera del rango de la PS para FZ, con un 3% de SDD y 4% de R según los PCC; 8% de las cepas está fuera del rango de PS para VZ y de ellas 5% son S (CMI  $\leq 0,125$   $\mu\text{g/mL}$ ), 2% son SDD y 1% son resistentes, según los PCC; 25% de las cepas está fuera del rango de PS

Tabla 2. Perfil de sensibilidad *in vitro* a cuatro antifúngicos, PCE y rango de población salvaje del Complejo *Candida parapsilosis* por el método de Etest® (n=328).

ATF	Número de aislamientos por CMI*																PCE* (CMI - %)	Rango PS*		
	0,002	0,003	0,004	0,006	0,008	0,012	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16			32	64
FZ							1	2	5	17	75	141	64	9	7	2		5	2 (93%)	0,03-2
VZ	1	1	2	5	15	24	186	68	17	5	1	1	1	1					0,06 (92%)	0,002-0,06
AB	41	4	5	6	13	22	92	64	47	26	8								0,06 (75%)	0,002-0,06
CS	4	2				2	3	11	61	147	90	5	1		2				0,5 (98%)	0,002-0,5

ATF: Antifúngico. FZ: fluconazol. VZ: voriconazol. AB: anfotericina b. CS: caspofungina. \*: CMI en µg/mL. PCE: punto de corte epidemiológico (Valor de la CMI y porcentaje de cepas que abarca); PS: población salvaje.

para AB, siendo todas sensibles, ya que se encuentran por debajo del PCC de R (CMI  $\geq 2$  µg/mL); 2,4% de las cepas se encuentra fuera del rango de PS para CS, manteniéndose el 1,8% susceptibles (CMI  $\leq 2$  µg/mL) y el 0,6% R, según los PCC. Estos resultados muestran la elevada sensibilidad del Complejo *C. parapsilosis* a los antifúngicos ensayados.

Las cepas utilizadas para el control de calidad de las pruebas de sensibilidad se mantuvieron dentro de los valores límites establecidos por el documento M27-S4.

## Discusión

Las infecciones del torrente sanguíneo causadas por *Candida* son una causa importante de enfermedad y, aunque *C. albicans* es el agente etiológico más frecuente de candidemias, la rápida expansión del Complejo *C. parapsilosis* refuerza la necesidad de vigilar su incidencia y perfil de sensibilidad [3]. Según Salavert y col [12], las infecciones por especies de *Candida* no *C. albicans* causan entre el 35 y 65% de todas las candidemias en general y las causadas por el Complejo *C. parapsilosis* se encuentran entre un 20 al 40%.

En este estudio, la mayoría de las candidemias fueron causadas por especies de *Candida* no *C. albicans*, siendo el Complejo *C. parapsilosis* el más comúnmente aislado (43,6%). Su incidencia está influenciada por el área geográfica, el tipo de paciente y la enfermedad de base. Estudios realizados en América Latina, España e India han reportado que este complejo ha ocupado el segundo, tercero o cuarto lugar de frecuencia como agente causal de candidemias [2,3,5-8,13].

En un estudio prospectivo multicéntrico español, que incluyó 44 hospitales, se evaluó la epidemiología de la candidemia causada por el Complejo *C. parapsilosis*, reportando que *C. parapsilosis sensu stricto* fue la más comúnmente aislada en las unidades de cuidados intensivos de adultos (28,8%), cirugía (20,9%), medicina interna (19,7%), neonatología (7%) y pediatría (6,7%) [31]. Otro estudio prospectivo, observacional y multicéntrico, que incluyó 29 hospitales distribuidos en cinco áreas metropolitanas de España, reportó que en pacientes adultos, hospitalizados en la unidad de terapia intensiva, el 48% de los casos de candidemia fueron causados por especies

de *Candida* no *C. albicans*, siendo *C. parapsilosis* la más común [32].

Almirante *et al* [3], reportaron que *C. parapsilosis* fue el primer agente causal de candidemia en neonatos de Cataluña (España), aunque *C. albicans* ocupó el primer lugar en el estudio, tomando en cuenta la población en general. Por otra parte, Puig-Asensio *et al* [33], informaron que, en neonatos hospitalizados en terapia intensiva, *C. albicans* fue la especie predominantemente aislada (45,4%), seguida de *C. parapsilosis* (24,9%), *C. glabrata* (13,4%) y *C. tropicalis* (7,7%).

En los pacientes con cáncer las candidemias han oscilado entre un 12-15%, relacionándose con el manejo inadecuado de los catéteres vasculares, material quirúrgico contaminado, alimentación parenteral y transmisión horizontal por parte del personal de salud [11,12,14]. Las candidemias por *C. parapsilosis* en Estados Unidos se han descrito en menores de un año debido a la prematuridad, uso de catéter y nutrición parenteral, mientras que en América Latina se presenta en todas las edades [2,12]. Nucci *et al* [2], reportaron el incremento de *C. parapsilosis* como segundo agente causal de candidemias en América Latina, pero, países participantes en el estudio como Venezuela y Colombia, ubicaron a esta especie como la primera causante de infecciones del torrente sanguíneo, con 39 y 38,5% respectivamente.

En nuestro país, Dolande y col [15], en un estudio piloto para evaluar el comportamiento de las especies de *Candida* provenientes de muestras clínicas en el área metropolitana de Caracas, reportaron que *C. parapsilosis* aislada del torrente sanguíneo ocupó el segundo lugar (26% de los aislamientos). Panizo *et al* [16], informaron que *C. parapsilosis* fue el agente más comúnmente aislado de episodios de candidemia (48,5%), seguido de *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. pelliculosa*, *C. intermedia*, *C. glabrata* y *C. lusitaniae*. Otros estudios sobre candidemia en Venezuela, han reportado porcentajes variables de aislamientos de *C. parapsilosis* entre 43 a 51%, resultados que coinciden con los obtenidos en este estudio [10,17,18].

Una limitante importante en esta investigación es el hecho de que no se disponía de los datos demográficos y epidemiológicos de los aislados, por lo tanto, no se pudieron establecer comparaciones relacionadas a estos tópicos y

el análisis se limitó sólo a los aspectos microbiológicos y algunos aspectos epidemiológicos derivados de los primeros.

Estudios *in vitro* han sugerido que la resistencia cruzada puede ocurrir entre fluconazol y otros compuestos azólicos. Este fenómeno depende de la regulación de los genes que codifican para las bombas de eflujo denominados CDR. La relevancia clínica de la resistencia cruzada entre los azoles ha sido informada en series de casos de candidemias, donde la resistencia a VZ se presentó en pacientes con inmunodeficiencias e importante exposición previa a FZ. Se ha reportado que *C. parapsilosis* puede presentar sensibilidad reducida y/o resistencia a FZ y VZ [27,28,34,35]. En este trabajo se pudo documentar la existencia de resistencia cruzada entre FZ y VZ, con una asociación estadísticamente significativa. La disminución de la sensibilidad a FZ puede preceder y predecir la disminución de la sensibilidad a otros azoles como VZ, posaconazol y ravuconazol. Esto implica que la vigilancia de las infecciones invasoras por *Candida* en pacientes con inmunodeficiencias debe continuar a pesar de la cobertura con VZ o posaconazol, sobre todo cuando el uso de estos antifúngicos es precedido por tratamientos prolongados con FZ [27,28,34]. Estas preocupaciones han llevado a algunos autores a sugerir pruebas de sensibilidad *in vitro* a fluconazol de aislamientos de *Candida* del torrente sanguíneo, como una forma de identificar a aquellos pacientes que podrían no responder de forma óptima a la terapia con VZ o posaconazol [35].

La vigilancia epidemiológica de los episodios de candidemia, así como el estudio de los valores de CMI de los antifúngicos, permite el establecimiento de PCE y conocer la distribución de la PS, con el fin de evaluar efectivamente la aparición de cepas con sensibilidad disminuida a los antifúngicos [27-29].

En este estudio, el PCE de FZ coincidió con el valor del PCC, agrupando el 93% de las cepas del complejo, resultado similar al obtenido por Pfaller *et al* [27], que determinó un PCE de 2 µg/mL para cepas de *C. parapsilosis*, agrupando al 93,2% de las mismas. El PCE no necesariamente tiene que coincidir con el PCC; su habilidad es detectar cepas con mecanismos de resistencia adquirida, y en este caso, su aplicación documentó la aparición constante de aislamientos del complejo con sensibilidad disminuida a FZ en el período estudiado, mientras que tal tendencia no se evidenció con el uso de los PCC. Es importante destacar que, aunque algunas cepas del Complejo *C. parapsilosis* poseen CMI que exceden el PCE y por ende el PCC en el caso de FZ, encontrándose fuera del rango de la PS, aún serían capaces de responder al tratamiento, aunque muestren sensibilidad reducida a este antifúngico o posean algún mecanismo de resistencia; sólo un pequeño porcentaje presentó resistencia a FZ [27].

En el caso de VZ, el PCE se encuentra 1 dilución por debajo del PCC, agrupando el 92% de las cepas del complejo. En el trabajo de Pfaller *et al* [28], el PCE se ubicó en 0,125 µg/mL, agrupando al 97,8% de las cepas de *C. parapsilosis*. En este trabajo, al igual que en el de Pfaller

*et al*, sólo un pequeño porcentaje de las cepas se encontraron fuera del rango de la PS y permanecen sensibles según el PCC; aunque su CMI excede el PCE y pudiesen poseer algún mecanismo de resistencia, aún pueden responder al tratamiento con este antifúngico. La importancia de aplicar el PCE es justamente mantener la vigilancia epidemiológica de la aparición de cepas con sensibilidad disminuida a VZ, ya que el PCE en este estudio sólo se encuentra a 1 dilución del PCC.

Para AB no se han descrito PCC especie específicos, tal y como los poseen otros antifúngicos, por lo tanto, la determinación de la PS y el PCE son medidas muy sensibles para detectar la emergencia de resistencia y pueden ser usadas para identificar aislamientos que pudiesen no responder apropiadamente al tratamiento debido a la adquisición de mecanismos de resistencia, sobre todo cuando los datos clínicos son limitados para lograr el establecimiento de los PCC especie específicos, como es el caso de este antifúngico. Pfaller *et al* [30] establecieron el PCE de AB para *C. parapsilosis* en 2 µg/mL, agrupando el 99,7% de las cepas en un estudio multicéntrico que incluyó los datos de sensibilidad a AB de 11 laboratorios, con un rango de PS de  $\leq 0,03-4$  y una M de 1 µg/mL, datos muy diferentes a los obtenidos en este trabajo. En nuestro estudio, el PCC de 0,06 µg/mL sugiere que sólo debe ser utilizado para determinar si un aislamiento clínico debe ser considerado o no PS, dependiendo de su CMI, conclusión similar a la obtenida en el trabajo mencionado anteriormente [30]. Es importante tener en cuenta que el uso continuo de los polienos puede producir un aumento de la presión selectiva, por lo tanto, es prudente la utilización del PCE, ya que proporcionará una medida para la vigilancia de la aparición de sensibilidad disminuida a este antifúngico. Según los PCC establecidos en el documento M27-S4 para AB, una CMI  $\geq 2$  µg/mL es inusual para la gran mayoría de las especies de *Candida* (exceptuando *C. krusei* y *C. lusitanae*), lo que sugiere que el tratamiento con este antifúngico, puede no ser el más adecuado [25,30].

Pfaller *et al* [29] establecieron el PCE de CS para *C. parapsilosis* en 1 µg/mL, con un rango de PS entre 0,015-4 y una M de 0,25 µg/mL en un trabajo multicéntrico en el que participaron más de 100 centros hospitalarios diferentes alrededor del mundo. En este trabajo, el PCE fue de 0,5 µg/mL, dos diluciones por debajo del PCC establecido (S:  $\leq 2$ ) y apenas una dilución de diferencia con el trabajo mencionado, un rango de PS mucho menor y una M idéntica. La distribución de las CMI obtenidas para CS en este trabajo mostró las típicas concentraciones elevadas que generalmente se obtienen al ensayar este antifúngico para el complejo, resultados similares al del trabajo de Pfaller *et al*. Al igual que para FZ, VZ y AB, con el PCE se puede lograr un máximo de detección de cepas con sensibilidad disminuida, generando un impacto mínimo en aquellas que se encuentran dentro del rango de PS.

Los valores de los rangos, MG, CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub> y porcentajes de resistencia de los cuatro antifúngicos ensayados en este estudio frente a cepas del Complejo *C. parapsilosis*,

son similares a los reportados por otros investigadores [2,3,5-7,10] (Tabla 3), con ligeras diferencias que ponen en evidencia la variabilidad que presenta esta especie en su respuesta frente a los antifúngicos, que podría estar relacionada con la ubicación geográfica, el tipo de paciente, su enfermedad de base y otras variables como el manejo inadecuado de los catéteres vasculares, material quirúrgico contaminado, alimentación parenteral y transmisión horizontal por parte del personal de salud, tal y como lo señalan las referencias citadas. Estas probablemente son las causas de la prevalencia de candidemia causada por cepas de este complejo, indicando fallas asociadas al control de infecciones nosocomiales [2,3,5,11-14].

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron observar el comportamiento *in vitro* del Complejo *C. parapsilosis* ante los antifúngicos más utilizados en el tratamiento de candidemias. Las pruebas de sensibilidad *in vitro* para FZ, VZ y CS son herramientas útiles para optimizar el tratamiento de la candidemia. Dada la ausencia de PCC especie específicos para *Candida* con AB, la utilización de estas pruebas es importante para establecer PCE y PS, así como para detectar la posible emergencia de cepas con sensibilidad disminuida a este antifúngico. La adecuada identificación de las levaduras provenientes de aislamientos clínicos es muy importante para el conocimiento de la epidemiología local. Es imprescindible

Tabla 3. Comparación entre los rangos, CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub> y porcentajes de resistencia de los cuatro antifúngicos ensayados en este estudio para el Complejo *Candida parapsilosis* y los de otras investigaciones.

Referencias	n	Fluconazol			Voriconazol			Anfotericina B			Caspofungina						
		Rango	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	R (%)	Rango	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	R (%)	Rango	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	R (%)				
Almirante <i>et al</i> [4]	78	0,125->64	NC	1	1 (1,3)	0,01-0,5	NC	0,03	0	0,002-<=0,5	NC	0,25	0	0,125 - 2	NC	2	0
Córdoba <i>et al</i> [18]	120	0,06-32	0,5	2	3 (2,5)	<0,015-0,5	<0,015	0,03	1 (0,8)	0,13-2	0,5	1	1 (0,8)	0,03-2	1	2	0
Cisterna <i>et al</i> [29]	204	0,125-64	0,5	4	11 (5,4)	0,03-4	0,125	0,5	3 (2,2)	0,25-1	1	1	0	0,125-64	1	2	12 (5,9)
Lopes <i>et al</i> [28]	21	0,125-8	0,5	4	0	0,008-0,125	0,016	0,064	0	0,032-0,5	0,125	0,125	0	0,064-4	1	2	2 (9,5)
Nucci <i>et al</i> [3]	178	0,125-4	0,25	1	0	0,03-0,25	0,03	0,25	0	0,25-1	0,5	1	0	ND	ND	ND	ND
Moreno y col [5]	63	0,25-8	2	4	2 (2,9)	0,007-1	0,06	0,125	1 (1,4)	0,007-1	0,125	0,8	0	0,007-2	0,25	1	0
Este estudio	328	0,031->64	1	2	14 (4,3)	<=0,002-4	0,03	0,125	3 (1,2)	<=0,002-0,5	0,03	0,25	0	<=0,002->=8	0,25	0,5	2 (0,6)

n: total de cepas analizadas en cada estudio; Rangos, CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> en µg/mL. CMI<sub>50</sub>: concentración que inhibe el 50% de los aislamientos; CMI<sub>90</sub>: concentración que inhibe el 90% de los aislamientos. NC: no calculado. ND: no determinado. R (%): número absoluto de cepas resistentes en cada estudio y porcentaje de resistencia.

que el médico conozca la actividad de estas drogas, para poder tomar decisiones y orientar una conducta terapéutica adecuada.

## Referencias

- Kocsubé S, Tóth C, Vágvolgyi I, Pesti I, Pócsi J, Varga J. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. *J Med Microbiol*. 2007; 56:190-5.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi I, Cortes J, Zurita J, *et al*. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013; 8:e59373. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601956/>. Acceso: 5 de marzo de 2015.
- Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, *et al*. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:1681-5.
- Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol*. 2014; 31:42-8.
- Córdoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat M, Taverna C, Szusz W, Murisengo O, *et al*. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2011; 43:176-85.
- Lopes A, Madeira G, Nóbrega J, Nascimento M, Rossi F. Candidemia epidemiology susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *J Infect Dis*. 2010; 14:441-8.
- Cisterna R, Ezpeleta G, Telleria O, Guinea J, Regueiro B, Garcia-Rodríguez J, *et al*. Nationwide sentinel surveillance of bloodstream *Candida* infections in 40 tertiary care hospitals in Spain. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:4200-6.
- Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, Quindós G. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66:2315-22.
- Cassone A, De Bernardis F, Pontieri E, Carruba G, Girmenia C, Martino P, *et al*. Biotypic diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical

- source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis.* 1995; 171:967-75.
10. Moreno X, Martínez G, Macero C. Complejo *Candida parapsilosis* como principal agente causal de fungemias en el Instituto Médico La Floresta. Caracas-Venezuela. Memorias del VIII Congreso Latinoamericano de Micología, Medellín, Colombia, 2014. *Actualidades Biológicas.* 2014; 36 (Suppl 1):371.
  11. Brito LR, Guimarães T, Nucci M, Rosas RC, Paula Almeida L, Da Matta DA, Colombo AL. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals *Clin Infect Dis.* 2010; 51:561-70.
  12. Salavert M, Jarque I, Pemán J. Los aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus implicaciones clinicoterapéuticas *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 24:36-45.
  13. Singh R, Xess I, Mathur P, Behera B, Gupta B, Misra M. Epidemiology of candidemia in critically ill trauma patients: experiences of a level I trauma centre on North India. *J Med Microbiol.* 2011; 60:342-6.
  14. Nucci N, Queiroz-Telles F, Tobón A, Restrepo A, Colombo A. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2010; 51:561-70.
  15. Dolande ME, Reviákina V, Panizo MM, Macero C, Moreno X, Calvo A, y col. Distribución y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos clínicos de *Candida* en seis centros de salud del área metropolitana de Caracas-Venezuela (Años 2003-2005). *Rev Iberoam Micol.* 2008; 25:17-21.
  16. Panizo MM, Reviakina V, Dolande M, Selgrad S. *Candida* spp. *in vitro* susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. *Med Mycol.* 2009; 47:137-43.
  17. Dolande ME, Panizo M, Reviakina V, Ferrara G, Moreno X, Macero C, y col. Candidemia en Venezuela. Red de Vigilancia a los Antifúngicos. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas-Venezuela. XVII Jornadas Nacionales y XV Zulianas de Infectología. *Bol Venez Infectol.* 2009; 20:63.
  18. Calvo B, Mesa L, Perozo A, Pineda M, Beltrán-Luengo H. Cambios en la distribución de especies de *Candida* aisladas de hemocultivos en pacientes del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, Venezuela. *Kasmera.* 2010; 38:106-17.
  19. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009; 42:503-35.
  20. Nucci A, Thompson-Moya L, Guzmán-Blanco M, Tiraboschi IN, Cortes JA, Echevarría J et al. Recommendations for the management of candidemia in adults in Latin America. *Rev Iberoam Micol.* 2013; 30:179-88.
  21. Panizo M, Reviákina V, Montes W, González G. Mantenimiento y prevención de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2005; 25:35-40.
  22. Pincus DH, Orenza S, Chatelier S. Yeast identification-past, present and future. *Med Micol.* 2007; 45:97-121.
  23. Pfaller MA, Diekema DJ, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ. Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:1875-80.
  24. Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC, Brown SD. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:1781-4.
  25. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: fourth informational supplement M27-S4. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
  26. Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(Suppl. 1): i13-8.
  27. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D, The 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; 13:180-95.
  28. Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Alexander BD et al. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species specific interpretive criteria. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2011; 70:330-43.
  29. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR et al. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat.* 2011; 14:164-76.
  30. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema DJ et al. Wild-Type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin b, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:2040-6.
  31. Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapixo I, Álvarez M et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55:5590-6.

32. Puig-Asensio M, Pemán J, Zaragoza R, Garnacho-Montero J, Martín-Mazuelos E, Cuenca-Estrella M *et al.* Impact of therapeutics strategies on the prognosis of candidemia in the ICU. *Crit Care Med.* 2014; 42:1423-32.
33. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R *et al.* Epidemiology and predictive factors for early mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20:O245-54.
34. Pfaller MA, Diekema DJ. Azole antifungal drug cross-resistance: mechanisms, epidemiology, and clinical significance. *J Invasive Fungal Infect.* 2007; 1:74-92
35. Magill SS, Shields C, Spears CL, Choti N, Merz WG. Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:529-35.