



Original

Identificación molecular y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos de sangre del complejo *Candida parapsilosis* en Venezuela



Xiomara Moreno^{a,*}, Vera Reviakina^b, María M. Panizo^b, Giuseppe Ferrara^b, Nataly García^b, Víctor Alarcón^b, María F. Garcés^c y Maribel Dolande^b

^a Departamento de Microbiología, Instituto Médico La Floresta, Caracas, Venezuela

^b Departamento de Micología, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Caracas, Venezuela

^c Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 6 de febrero de 2016

Aceptado el 17 de noviembre de 2016

On-line el 28 de abril de 2017

Palabras clave:

Candidemia

Complejo *Candida parapsilosis*

Candida parapsilosis sensu stricto

Candida orthopsilosis

Candida metapsilosis

Sensibilidad

Antifúngicos

R E S U M E N

Antecedentes: *Candida parapsilosis* constituye un complejo de especies formado por *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*. Estudios a nivel mundial han descrito su epidemiología y sensibilidad a los antifúngicos.

Objetivos: Los objetivos de este trabajo fueron identificar molecularmente aislamientos de sangre del complejo *Candida parapsilosis* y determinar su sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de uso sistémico.

Métodos: Se estudiaron 86 aislamientos del complejo *C. parapsilosis*, provenientes de la Red de Vigilancia de Candidemia del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, recogidos en el periodo 2008–2011. Se realizó la amplificación del gen de la deshidrogenasa alcohólica secundaria por reacción en cadena de la polimerasa y los productos fueron analizados mediante los polimorfismos de la longitud de sus fragmentos de restricción, mediante el uso de la enzima *BanI*. Las pruebas de sensibilidad se realizaron mediante Etest[®] según las instrucciones del fabricante, con modificaciones.

Resultados: De los 86 aislamientos estudiados, 81 (94,2%) fueron *C. parapsilosis sensu stricto*, 4 (4,6%) *C. orthopsilosis* y uno (1,2%) *C. metapsilosis*. *C. parapsilosis* fue sensible a la anfotericina B y la caspofungina, y su porcentaje de resistencia al fluconazol y el voriconazol fue bajo. *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* fueron sensibles a todos los antifúngicos probados.

Conclusiones: Los resultados aportaron por primera vez en Venezuela información importante sobre la distribución del complejo *C. parapsilosis* en casos de candidemia, y apoyan la necesidad de continuar con los programas de vigilancia, incluyendo la discriminación molecular de las especies y las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, que permitirán orientar la terapia específica.

© 2017 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Molecular identification and *in vitro* antifungal susceptibility of blood isolates of the *Candida parapsilosis* species complex in Venezuela

A B S T R A C T

Background: *Candida parapsilosis* is a species complex consisting of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis*. Studies worldwide have described its epidemiology and susceptibility to antifungal agents.

Aims: The aims of this study were to carry out the molecular identification of blood isolates belonging to the *Candida parapsilosis* species complex, and to determine their *in vitro* susceptibility to antifungals of systemic use.

Methods: A study of 86 strains of *C. parapsilosis* species complex collected in 2008–2011 and obtained from the Candidaemia Surveillance Network of Mycology Department of the Rafael

Keywords:

Candidaemia

Candida parapsilosis species complex

Candida parapsilosis sensu stricto

Candida orthopsilosis

Candida metapsilosis

Susceptibility

Antifungal agents

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: x.morenoc@hotmail.com (X. Moreno).

Rangel National Institute of Hygiene, was made. Secondary alcohol-dehydrogenase gene amplification was performed using polymerase chain reaction, and the products were analysed by restriction fragments length polymorphisms using the enzyme *BanI*. Susceptibility tests were performed using Etest[®], following the manufacturer's instructions with modifications.

Results: Of the 86 isolates studied, 81 (94.2%) were *C. parapsilosis sensu stricto*, 4 (4.6%) *C. orthopsilosis*, and one (1.2%) *C. metapsilosis*. *C. parapsilosis* isolates were susceptible to amphotericin B and caspofungin, showing low rates of resistance to fluconazole and voriconazole. *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* were susceptible to all the antifungals tested.

Conclusions: The results obtained in Venezuela provide for the first time important information about the distribution of *C. parapsilosis* species complex in cases of candidaemia, and support the need for continuing surveillance programs, including molecular discrimination of species and antifungal susceptibility tests, which may guide specific therapy.

© 2017 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Durante la última década la incidencia de *Candida parapsilosis* se ha incrementado drásticamente, llegando a situarse como la segunda levadura más frecuentemente aislada en hemocultivos, después de *Candida albicans*²⁸.

La variabilidad genética de *C. parapsilosis*, descrita por el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del gen de la deshidrogenasa alcohólica secundaria (*SADH*), llevó a su separación en tres grupos, con la consiguiente conformación de un complejo de especies: *C. parapsilosis sensu stricto* (grupo I), *C. orthopsilosis* (grupo II) y *C. metapsilosis* (grupo III)^{6,24,25}. Curiosamente, una serie de alelos de *C. parapsilosis sensu stricto* están presentes en cepas de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, pero alelos de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* no se han detectado en *C. parapsilosis sensu stricto*. Esto evidencia que esta última podría haber surgido hace poco tiempo, por divergencia de una subpoblación genéticamente homogénea; su elevada distribución global y alta tasa de aislamiento en muestras clínicas avala su naturaleza clonal e indican una veloz propagación geográfica, debido a su rápida transmisión horizontal de persona a persona y excelente adaptación como comensal al ser humano, en contraposición a lo observado en sus dos especies hermanas^{13,25}.

Estudios sobre la sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos del complejo *C. parapsilosis* (CCP) han reportado valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) elevados para la anfotericina B (AB), las equinocandinas y los azoles, específicamente el fluconazol (FZ) para *C. parapsilosis sensu stricto*, mientras que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* suelen presentar valores CMI más bajos^{11,27}; en otro estudio, sin embargo, se encontraron valores CMI similares entre todas las especies¹². Esto evidencia la necesidad de realizar la identificación molecular de los aislamientos pertenecientes a este complejo, ya que pueden existir diferencias en el patrón de sensibilidad a los antifúngicos, particularmente para los azoles y las equinocandinas¹⁴.

Materiales y métodos

Procedencia de los aislamientos

Se estudiaron 86 aislamientos del CCP provenientes de la Red de Vigilancia de Candidemias del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, escogidos al azar y aislados en el periodo 2008–2011. Los aislamientos se mantuvieron preservados por el método de agua de Castellani¹⁸ hasta el momento de su procesamiento.

Preparación de los aislamientos

La recuperación de los aislamientos se realizó mediante pases sucesivos en agar Sabouraud dextrosa y su incubación durante 24–48 h a 35 °C. Se constató así su viabilidad y pureza. La

identificación taxonómica de las cepas se realizó mediante pruebas fenotípicas: 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 el uso de Vitek[®] 2 Compact (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia).

Extracción del ADN genómico

Se preparó en solución salina estéril al 0,85% una suspensión de los aislamientos a una concentración 0,5 McFarland en un densitómetro (Densimat[™], bioMérieux) a 530 nm; el ADN genómico fue extraído mediante la utilización del QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen SADH

Se siguió el protocolo descrito por Tavanti et al.²⁵ y se estandarizó a las condiciones del laboratorio de micología molecular del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Para la preparación de la mezcla de reacción se utilizaron los siguientes reactivos: 5 µl de ADN genómico; 0,5 µl de Taq polimerasa 5 U/µl (KAPATaq[™], HotStart-Kapa Biosystems); 5 µl de *buffer* libre de magnesio 10X (Invitrogen); 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen); 2,4 µl de ditiotreitolo 0,1 mM (Invitrogen); 0,1 µl de inhibidor recombinante de ribonucleasas 40 U (Invitrogen); 1 µl de DNTP 10 mM; 1 µl de cada uno de los cebadores 5'-GTT GAT GCT GTT GGA TTG T-3' y 3'-CAA TGC CAA ATC TCC CAA-5' (Bioneer, Inc.) y 32,5 µl de agua libre de nucleasas, para completar un volumen de 50 µl. La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador modelo iCycler[®] (SensoQuest) bajo las siguientes condiciones: un primer ciclo de desnaturalización de 7 min a 94 °C; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 60 s y elongación a 72 °C durante 90 s; se terminó con un ciclo de elongación final a 72 °C durante 5 min.

El producto obtenido fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, para observar así la presencia de un producto de 716 pb que distingue a los aislamientos dentro del CCP. Se utilizó un marcador de 100 pb de peso molecular (Amersham GE Healthcare) y la visualización se realizó en el sistema de documentación de imágenes Gel Doc XR[®] con el *software* de análisis 1D Quantity One[®] (Laboratorios Bio-Rad).

Análisis del fragmento SADH mediante enzimas de restricción²⁵

Los amplicones obtenidos por PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *BanI* (New England Biolabs, Ipswich, MA), con la siguiente mezcla de reacción: 0,14 µl de enzima *BanI* (Invitrogen); 1,4 µl de *buffer* 10X (Invitrogen); 0,14 µl de BSA 100X (Invitrogen); 7 µl del producto de PCR y 5,32 µl de agua grado

molecular, para completar un volumen total de 14 μ l; posteriormente se incubaron a 37 °C en un termobloque durante 2 h. Los productos de digestión obtenidos fueron sometidos a electroforesis y análisis posterior bajo las condiciones descritas anteriormente. Los aislamientos analizados debían presentar productos de 550 y 200 pb, 750 pb y 400 pb para ser discriminados molecularmente como *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, respectivamente.

Control de calidad

Se utilizaron los siguientes reactivos: 1) ADN comercial de 500 pb como control de la reacción de PCR (Laboratorios Perkin-Elmer, Estados Unidos); 2) agua libre de nucleasas como control de reactivos; 3) las cepas de colección de *C. parapsilosis* ATCC 22019 y ATCC 90018; *C. orthopsilosis* ATCC 96139 y ATCC 96141; *C. metapsilosis* ATCC 96144 y ATCC 96143 como controles positivos, y 4) la cepa de colección de *Candida tropicalis* ATCC 66029 como control negativo. Todos los controles fueron procesados bajo las mismas condiciones de los aislamientos en estudio a fin de detectar posibles contaminaciones y validar los resultados obtenidos.

Estudio de la sensibilidad a los antifúngicos

Para la preparación de los inóculos se utilizaron colonias de los aislamientos sembrados en agar Sabouraud dextrosa; las colonias se suspendieron en solución salina estéril a un valor de 0,5 en la escala de McFarland con la ayuda de un densitómetro (Densimat™, bioMérieux) a 530 nm. Para el estudio de la sensibilidad se utilizó el método Etest® (AB bioMérieux) bajo las instrucciones del fabricante^{4,22}, pero con la modificación del uso de agar Müeller Hinton suplementado con glucosa al 2% más azul de metileno. Sobre el agar en las placas de Petri se colocaron en cada caso las tiras de FZ (0,016–256 μ g/ml), caspofungina (CS), AB y voriconazol (VO) (0,002–32 μ g/ml para estos tres últimos antifúngicos). Las placas se incubaron a 35 °C y la CMI se leyó a las 24 h, con un tiempo final máximo de 48 h. Como control de calidad se utilizaron las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258, tratadas de igual forma que los aislamientos empleados en este estudio.

Criterios de interpretación de la CMI

La lectura de la CMI se realizó en el punto de intersección de la elipse producida por la zona de inhibición, según la escala de medición de cada una de las tiras. Para la interpretación de las CMI se utilizaron los valores establecidos en el documento de referencia M27-S4 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)²⁶. El Etest® posee un gradiente continuo de CMI y para correlacionar los valores con los del método de referencia los valores situados entre dos diluciones consecutivas fueron llevados a la dilución inmediatamente superior del método; los valores en el límite superior de la tira fueron llevados a la máxima concentración permitida y los valores en el límite inferior se mantuvieron sin cambios²¹. Los criterios de interpretación utilizados fueron aislamiento sensible (S), aislamiento sensible dependiente de la dosis (SDD), aislamiento de sensibilidad intermedia (I) y aislamiento resistente (R), según los puntos de corte clínicos en μ g/ml establecidos en el ya mencionado documento. Estos puntos son, para FZ, $S \leq 2$; $SDD = 4$ y $R \geq 8$; para VO, $S \leq 0,125$; $SDD = 0,25-0,5$ y $R \geq 1$; para AB, $S \leq 1$ y $R \geq 2$; y para CS, $S \leq 2$; $I = 4$ y $R \geq 8$.

Análisis de los datos

Los datos se describieron mediante porcentajes. Para describir la distribución de las CMI frente a los distintos antifúngicos ensayados se emplearon medidas de dispersión como rangos de concentración y los percentiles 50 y 90, que representan los valores de CMI

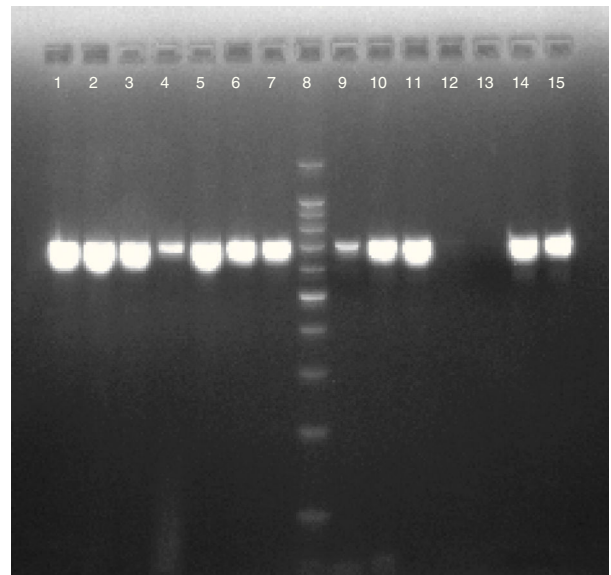


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR-SADH para los aislamientos del CCP. Calles 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 14 y 15: aislamientos del CCP (716 pb). Calle 5: *C. parapsilosis* ATCC 22019. Calle 8: marcador de peso molecular 100 pb. Calle 11: *C. parapsilosis* ATCC 90018. Calle 12: agua libre de nucleasas. Calle 13: *Candida tropicalis* ATCC 66029.

que inhiben al 50 y al 90% de los aislamientos, respectivamente. La relación entre los valores de sensibilidad y resistencia entre el FZ y el VO para las cepas estudiadas se analizó mediante las tablas de contingencia y la prueba de Chi cuadrado con corrección de Yates mediante el programa Statgraphics 5.0. Un valor de $p \leq 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados

De cada uno de los 86 aislamientos estudiados se obtuvo un producto de 716 pb al realizarse el análisis molecular del gen *SADH*, resultado que confirmó su situación dentro del CCP (fig. 1). Mediante la utilización de la enzima de restricción *BanI* se encontró que 81 aislamientos (94,2%) fueron *C. parapsilosis sensu stricto*, 4 (4,6%) *C. orthopsilosis* y uno (1,2%) *C. metapsilosis* (fig. 2).

Los resultados obtenidos para los rangos de sensibilidad, percentiles 50 y 90 de las CMI y los porcentajes de S, SDD, I y R de las tres especies para los antifúngicos ensayados se presentan en la tabla 1. Según los puntos de corte establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute*, *C. parapsilosis* fue sensible a AB y CS, y presentó bajos porcentajes de resistencia a FZ y VO. *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* fueron sensibles a todos los antifúngicos probados. Debido al escaso número de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* obtenido no se pudieron comparar los perfiles de sensibilidad entre las tres especies.

Setenta y cuatro cepas de *C. parapsilosis* fueron S a FZ y VO (91,4%); 2 fueron SDD a FZ y S a VO (2,5%); una fue R a FZ y S a VO (1,2%); 2 fueron R a FZ y SDD a VO (2,5%) y 2 fueron R a FZ y VO (2,5%), lo que implica la presencia de resistencia cruzada; la asociación entre los valores de S, SDD y R para FZ y VO fue estadísticamente significativa con un 99% de confianza ($p < 0,01$).

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

Discusión

Las infecciones del torrente sanguíneo causadas por levaduras del género *Candida* han emergido en las últimas dos décadas,

Tabla 1
Rango de sensibilidad, CMI₅₀, CMI₉₀ y porcentaje de aislamientos S, SDD y R de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* a cuatro antifúngicos por Etest® (n=86)

N.º de aislamientos	ATF	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	n (%)		
					S	SDD	R
<i>C. parapsilosis</i> (81)	FZ	0,125- ≥ 64	1,098	2	74(91,3)	2(2,5)	5(6,2)
	VO	0,006-4	0,037	0,125	77(95,06)	2(2,47)	2(2,47)
	AB	≤ 0,002-0,5	0,039	0,125	81(100)		
	CS	≤ 0,002-1	0,289	0,5	81(100)		
<i>C. orthopsilosis</i> (4)	FZ	0,5-2	1	1	4(100)		
	VO	0,03-0,125	0,030	0,125	4(100)		
	AB	≤ 0,002-0,125	0,040	0,125	4(100)		
	CS	0,012-0,25	0,2	0,25	4(100)		
<i>C. metapsilosis</i> (1)	FZ	0,5			1(100)		
	VO	0,012			1(100)		
	AB	0,03			1(100)		
	CS	0,125			1(100)		

AB: anfotericina B; ATF: antifúngico; CMI₅₀: concentración que inhibe el 50% de los aislamientos; CMI₉₀: concentración que inhibe el 90% de los aislamientos; CS: caspofungina; FZ: fluconazol; R: resistente; S: sensible; SDD: sensible dependiente de la dosis; VO: voriconazol.

Todos los valores se expresan en µg/ml.

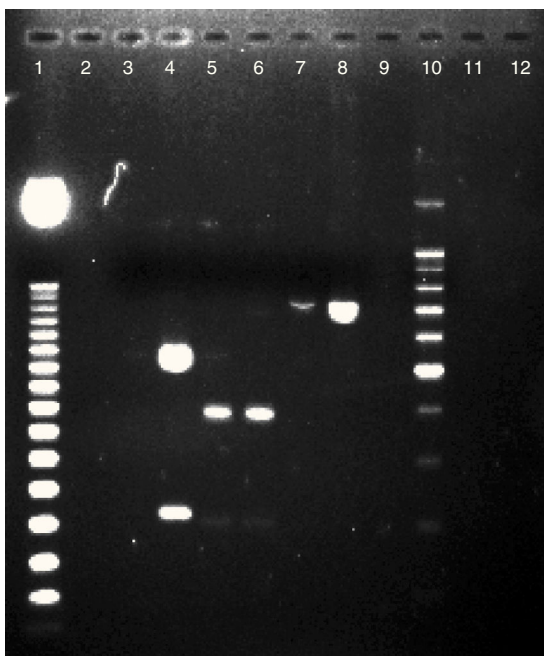


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR-SADH digeridos por la enzima de restricción *BanI*, para la caracterización de las especies del CCP. Calle 1: marcador de peso molecular de 50 pb. Calle 2: agua libre de nucleasas. Calle 3: *Candida tropicalis* ATCC 66029. Calle 4: *C. parapsilosis* ATCC 22019 (550 y 200 pb). Calle 5: aislamiento de *C. metapsilosis* (400 pb). Calle 6: *C. metapsilosis* ATCC 96144 (400 pb). Calle 7: aislamiento de *C. orthopsilosis* (750 pb). Calle 8: *C. orthopsilosis* ATCC 96139 (750 pb). Calle 9: *Candida tropicalis* ATCC 66029. Calle 10: marcador de peso molecular 100 pb. Calles 11 y 12: agua libre de nucleasas.

y aunque *C. albicans* es el agente etiológico más frecuente de candidemias a nivel mundial, la rápida expansión del CCP refuerza la necesidad de vigilar su incidencia y conocer su perfil de sensibilidad a los antifúngicos². Salavert Lletí et al.²³ han descrito que las infecciones por especies de *Candida* no-*C. albicans* representan del 35 al 65% de todas las candidemias en general, donde el CCP oscila entre un 20 y un 40%. Las candidemias por *C. parapsilosis* en Estados Unidos se han descrito en niños menores de un año debido a prematuridad, uso de catéter y nutrición parenteral, mientras que en América Latina se presentan en todas las edades^{16,23}.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los de otras investigaciones internacionales, donde *C. parapsilosis sensu stricto* fue la más frecuentemente aislada en muestras clínicas, particularmente de sangre, seguida por *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* en menor proporción^{3,6,11,24,26,27}.

La identificación molecular de estas especies es de suma importancia en nuestro país debido a la elevada frecuencia de aislamiento del CCP. Según un estudio de Dolande Franco et al.⁸, *C. parapsilosis* aislada del torrente sanguíneo ocupó el segundo lugar (26% de los aislamientos); por su parte, según Panizo et al.¹⁷, *C. parapsilosis* fue el agente más comúnmente aislado de episodios de candidemia (48,5%). Otros estudios sobre candidemia en Venezuela han publicado porcentajes variables (43-51%) de aislamientos de *C. parapsilosis*^{5,7,15}. Nucci et al.¹⁶ describen el incremento de *C. parapsilosis*, que se situaría como segundo agente causal de candidemias en América Latina, pero países participantes en el estudio, como Venezuela y Colombia, sitúan a esta especie como la primera causante de infecciones del torrente sanguíneo, con un 39 y 38,5%, respectivamente.

Una limitación importante en esta investigación fue no disponer de los datos demográficos y epidemiológicos asociados a las infecciones, por lo que no se pudieron establecer comparaciones con estas variables y el análisis se limitó solo a los aspectos microbiológicos.

Los aislamientos de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* en sangre demuestran que ambas levaduras pueden comportarse como patógenos para el ser humano. Curiosamente, *C. metapsilosis* no ha sido aislada con frecuencia de muestras clínicas y, según estudios *in vitro*, carece de la virulencia mostrada por *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*. Estas dos últimas, sin embargo, han sido aisladas en uñas, piel, pulmones, orina, catéteres y sangre, comportándose no solo como comensales, sino como patógenos, lo que resalta su importancia clínica^{2,10,11,25}.

Existen pocas publicaciones que hayan informado acerca de los perfiles de sensibilidad de las tres especies, si bien los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con ellos (tabla 2); ello incluye la ausencia de análisis comparativos debido al escaso número de aislamientos de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*^{6,11,24,26,27}. La estandarización existente entre los métodos que se utilizan actualmente para la evaluación de la sensibilidad a los antifúngicos, como los desarrollados por el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad a los Antibióticos (*European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*) y el *Clinical and Laboratory Standards Institute*, permiten la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los de otras series. Se ha demostrado que el Etest® es una técnica sencilla, rápida, económica y fácil de implementar en un laboratorio de microbiología de rutina, cuyos resultados son comparables a los obtenidos por los métodos de referencia^{1,4,9,19,22}.

Existen en la literatura opiniones encontradas acerca de la utilidad para el laboratorio clínico de la discriminación molecular de las tres especies, basadas en las ligeras diferencias existentes en sus

Tabla 2Número de aislamientos, rango de sensibilidad, CMI₅₀ y CMI₉₀ frente a los cuatro antifúngicos ensayados y resultados de otras investigaciones

Autor	ATF	<i>Candida parapsilosis</i>				<i>Candida orthopsilosis</i>				<i>Candida metapsilosis</i>				
		n	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	n	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	n	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	
Este estudio	FZ	81	0,125- ≥ 64	1,098	2	4	0,5-2	1	1	1	0,5			
	VO		0,006-4	0,037	0,125		0,03-0,125	0,03	0,125		0,12			
	AB		≤ 0,002-0,5	0,039	0,125		≤ 0,002-0,125	0,04	0,125		0,03			
	CS		≤ 0,002-1	0,289	0,5		0,012-0,25	0,2	0,25		0,125			
Gomez-López et al. ¹¹	FZ	76	0,12-64	0,5	5	0,02-0,5	0,5	6	0,5-8	1				
	VO		0,02-5	0,02		0,02-0,03	0,03		0,02-0,12	0,03				
	AB		0,06-0,5	0,12		0,03-0,12	0,06		0,06-0,12	0,09				
	CS		0,12-1	0,5		0,12-0,25	0,12		0,12-0,5	0,25				
Tay et al. ²⁶	FZ	21	0,094-6	0,75	4	8	0,25-1,5	0,38	1,5	2	1,5			
	VO		0,006-0,125	0,032	0,047		0,006-0,125	0,012	0,125		0,024			
	AB		<0,002-0,75	0,047	0,75		0,006-0,125	0,023	0,125		0,02			
	CS ^a													
Silva et al. ²⁴	FZ	160	0,125-64		4	0,5-1		5	1-4					
	VO		≤ 0,015-8			≤ 0,015-0,03			≤ 0,015-0,125					
	AB		0,06-2			0,5			0,125-1					
	CS		0,06-32			1-2			1-2					
De Toro et al. ⁶	FZ ^a	111			10			1						
	VO		<0,03-0,125	0,03		0,03	0,03-0,5		0,06				0,125	0,06
	AB		0,125-1	1		1	0,25-1		0,5				1	0,5
	CS ^a													

AB: anfotericina B; ATF: antifúngicos; CMI₅₀: concentración que inhibe el 50% de los aislamientos; CMI₉₀: concentración que inhibe el 90% de los aislamientos; CS: caspofungina; FZ: fluconazol; VO: voriconazol.

Todos los valores se expresan en µg/ml.

^a Antifúngico no probado.

perfiles de sensibilidad a los antifúngicos^{6,11}. Aunque las diferencias son sutiles, los datos obtenidos en este estudio evidencian que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* son más sensibles a AB y CS que *C. parapsilosis*; este hecho puede tener relevancia clínica e influir en las decisiones terapéuticas, sobre todo en nuestro país, según los estudios nacionales realizados^{5,6,8,15,17}.

La relevancia clínica de la resistencia cruzada entre los azoles ha sido informada en series de casos de candidemias. Se ha descrito que *C. parapsilosis* puede presentar sensibilidad reducida o resistencia a FZ y VO²⁰, resultados que concuerdan con los obtenidos en este estudio, que a su vez implican la necesidad de continuar con la vigilancia de casos de candidemias y el uso de VO, sobre todo cuando es precedido por tratamientos prolongados con FZ.

Aunque los métodos moleculares no se encuentran disponibles de forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico microbiológico, la separación de las tres especies del CCP puede realizarse de forma sencilla mediante la utilización del análisis del fragmento *SADH* mediante enzimas de restricción²⁵. Recomendamos este método como una alternativa para la caracterización molecular, ya que los métodos bioquímicos y morfológicos no poseen suficiente sensibilidad para lograr la discriminación.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo aportan por primera vez en Venezuela información importante sobre la distribución de aislamientos del CCP en episodios de candidemias, y apoyan la necesidad de continuar con los programas de vigilancia e incluir la discriminación molecular de las especies del complejo y la realización de pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Estos resultados muestran también que pueden existir sutiles diferencias especie-específicas entre las CMI encontradas en los ensayos de sensibilidad a los antifúngicos en el CCP, particularmente para AB y CS, que pudieran tener relevancia clínica y posibilitarían orientar de forma más específica la terapia antifúngica.

Conflicto de intereses

No existe ningún conflicto de intereses por parte de los autores en esta investigación.

Agradecimientos

Al Dr. Geber Peña por contribuir con los reactivos para las pruebas moleculares.

Bibliografía

- Alastruey-Izquierdo A, Melhem MS, Bonfietti LX, Rodríguez-Tudela JL. Susceptibility test for fungi: Clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57:57–64.
- Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, et al., the Barcelona Candidemia Project Study Group. 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.
- Azadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan Z. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol*. 2009;58:745–52.
- 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.
- 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 [consultado 5 Dic 2015]. Disponible en: <http://200.74.222.178/index.php/kasmera/article/view/4860>
- De Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2010;17:418–24.
- Dolande ME, Panizo M, Reviakina V, Ferrara G, Moreno X, Macero C, et al. 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.
- Dolande Franco ME, Reviakina V, Panizo MM, Macero C, Moreno X, Calvo A, et al. 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.
- Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Cantón E. EUCAST and CLSI: Working together towards a harmonized method for antifungal susceptibility testing. *Curr Fungal Infect Rep*. 2013;7:59–67.
- Gacser A, Schafer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol*. 2007;44:1336–41.
- Gomez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Rodríguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodríguez-Tudela JL, et al., the Barcelona Candidemia Project Study Group. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: Results from a population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1506–9.

12. Kocsubé S, Tóth M, Vágvyölgyl C, Dóczy I, Pesti M, Pócsi I, et al. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis sensu lato* in Hungary. *J Med Microbiol.* 2007;56:190–5.
13. Kuhn DM, Mukherjee PK, Clark TA, Pujol C, Chandra J, Hajjeh RA, et al. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:1074–81.
14. Mirhendi H, Bruun B, Schönheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, et al. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: Proposal of a new RFLP profile for differentiation. *J Med Microbiol.* 2010;59:414–20.
15. 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. *Actual Biol.* 2014;36 Suppl 1:371.
16. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al., on behalf of the Latin American Invasive Mycosis Network. Epidemiology of candidemia in Latin America: A laboratory-based survey. *PLoS One.* 2013;8:e59373 [consultado 5 Dic 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601956/>.
17. 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.
18. Panizo MM, Reviakina V, Montes W, González G. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2005;25:35–40.
19. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1592–9.
20. Pfaller MA, Diekema DJ. Azole antifungal drug cross-resistance: Mechanisms, epidemiology, and clinical significance. *J Invasive Fungal Infect.* 2007;1:74–92.
21. 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.
22. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: Report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1440–6.
23. Salavert Lletí M, Jarque Ramos I, Pemán García J. Los aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus implicaciones clinicoterapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:36–45.
24. Silva A, Miranda I, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues A. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in tertiary care hospitals. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2392–7.
25. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005;43:284–92.
26. Tay ST, Na SL, Chong J. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolates from patients with bloodstream infections. *J Med Microbiol.* 2009;58:185–91.
27. Treviño-Rangel RJ, Garza-González E, González JG, Bocanegra-García V, Llaça JM, González GM. Molecular characterization and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis* species complex of clinical isolates from Monterrey, Mexico. *Med Mycol.* 2012;50:781–4.
28. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:606–25.