



Instituto de Medicina Tropical
“Pedro Kouri”

Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología- Micología

Factores de virulencia y susceptibilidad antifúngica de aislados de
***Candida* spp. de 2018-2019. IPK, 2022.**

Autora: Lic. Yaumara Pedraye Soto

Tutores: Lic. Mayda Rosa Perurena Lancha, M Sc.

Lic. Carlos Manuel Fernández Andreu, Dr C.



La Habana, 2022

DEDICATORIA

A mis hijos Pedro Pablo y Juan David

A mi esposo

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento en primer lugar a Dios el señor que me ha enseñado que todo lo puedo en Cristo que me fortalece.

Mi agradecimiento al Departamento de Docencia y Bacteriología-Micología, por contribuir en mi formación profesional como maestrante. Especialmente a Maria Teresa y Gilda.

A mis tutores: Lic. Mayda Rosa Perurena Lancha, M Sc. y Lic. Carlos Manuel Fernández Andreu, Dr C. por sus conocimientos y experiencia en el curso de esta tesis.

A mi cuñado Yoel por su gran ayuda en la estadística.

A Yan por siempre estar dispuesto

A Rocío por todos los arreglos

A Yenis querida gracias

A Tony el de medios de cultivos sin él no hubiese podido hacer los experimentos gracias.

A Juan Carlos mi amado esposo, familia, mi ayuda, sin los recursos que me proporcionaste no podía llegar hasta aquí.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología del Instituto de Oncología por hacer mi trabajo mientras yo me superaba. Gracias Lourdes y Yilliam.

A mis hijos por entender mi poca atención en las largas jornadas de estudio.

A todos mil gracias.

Resumen

Las infecciones fúngicas invasoras (IFI) son causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados. La mayoría de las IFI nosocomiales en unidades de cuidados intensivos tanto en pacientes pediátricos como en adultos son causadas por especies de *Candida*. La candidiasis invasora ocurre cuando las levaduras del género *Candida* alcanzan el torrente sanguíneo, desde donde pueden diseminarse a cualquier tejido de la anatomía humana. Los principales atributos de virulencia de estas levaduras, que contribuyen a la aparición del cuadro clínico son el dimorfismo, la adherencia, la producción de biopelículas y la secreción de enzimas líticas. Con el desarrollo de nuevos antifúngicos se comenzó a observar el aislamiento cada vez con mayor frecuencia, de cepas de levaduras con susceptibilidad disminuida o resistentes a los antifúngicos. Por lo que se hizo necesario determinar la susceptibilidad in vitro a los antifúngicos para orientar el tratamiento. Se estudiaron todos los aislados de candidiasis sistémica, recibidos en Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) entre los años 2018-2019. Con el objetivo de profundizar sobre los factores de virulencia relacionados con la producción de enzimas hidrolíticas y evaluar el perfil de susceptibilidad antifúngica in vitro frente a anfotericina B, fluconazol e itraconazol, por el método de Etest®. Se procesaron un total de 58 aislados distribuidos en 6 especies: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii* y *C. glabrata*. Un total de 42 aislados presentaron actividad proteasa (72,41%), la actividad enzimática que exhibió menor frecuencia de expresión fue la fosfolipasa con 13 aislados positivos (22,41%), 11 aislados produjeron ambas enzimas (18,96%). Se encontraron cuatro aislados resistentes a la anfotericina B, tres de *Candida tropicalis* y uno de *Candida albicans*. El 75,86% de los aislados fue susceptible al fluconazol y 82,76% fueron sensibles al itraconazol. Los mayores valores de concentración mínima inhibitoria del fluconazol ($\geq 64 \mu\text{g/mL}$) los mostró un aislado de *Candida glabrata*. Los resultados en el presente trabajo permiten tener una comprensión más completa de la etiología de la candidiasis invasora en nuestro medio, lo que es de gran valor epidemiológico y terapéutico, sobre todo si se tiene en cuenta que la candidiasis es una de las principales enfermedades fúngicas invasoras que afectan la población cubana.

Índice

Introducción	1
CAPITULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
1.1. Definición.....	6
1.2. Agente etiológico	6
1.3. Taxonomía	7
1.4. Patogenia	7
1.5. Factores de virulencia	8
1.5.1. Dimorfismo.....	9
1.5.2. Adherencia.....	9
1.5.3. Biopelículas.....	10
1.5.4. Cambio fenotípico	10
1.5.5. Hidrofobicidad a la superficie celular	10
1.5.6. Enzimas	11
1.6. Epidemiología.....	12
1.7. Formas clínicas	13
1.7.1. Candidiasis invasora.....	13
1.7.2. Factores de Riesgos	13
1.8. Diagnóstico de Laboratorio.....	14
1.9. Pruebas de susceptibilidad in vitro.	16
1.9.1. Métodos usados para el estudio de la susceptibilidad antifúngica in vitro.	16
1.10. Tratamiento	18
1.10.1. Nuevos fármacos antifúngicos	20
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	21

2.1 Diseño de estudio.....	21
2.2 Muestra de estudio.....	21
2.2.1 Identificación de los aislados:	22
2.3 Determinación de factores de virulencia.....	22
2.3.1 Producción de enzimas.....	22
2.4 Pruebas de susceptibilidad antifúngica ETest	24
2.5 Análisis estadístico	26
2.6 Aspectos éticos	26
CAPÍTULO 3. RESULTADOS.....	27
3.1 Actividad enzimática.....	27
3.2. Pruebas de Susceptibilidad	30
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFIA	50
Anexos	

Introducción

Las infecciones fúngicas invasoras (IFI) son causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados, incrementan los días de hospitalización así como los costos. La mayoría de las IFI nosocomiales en pacientes pediátricos y adultos son causadas por especies de *Candida* en aquellos alojados en unidades de cuidados intensivos y en los neonatos. (Pana *et al.*, 2017).

La candidiasis invasora ocurre cuando las levaduras del género *Candida* alcanzan el torrente sanguíneo, desde donde pueden diseminarse a cualquier tejido de la anatomía humana. Incluye un amplio espectro: candidemia con endoftalmitis o sin ella, infecciones hematógenas diseminadas, compromiso de un órgano (infecciones abdominales, peritonitis, meningitis y endocarditis) y candidiasis hepatoesplénica, principalmente en pacientes con enfermedad hematológica. La fuente de infección por *Candida* spp. puede ser endógena (de la microbiota gastrointestinal o de la colonización mucocutánea) o exógena (de las manos de los trabajadores de la salud, de objetos o soluciones intravenosas contaminadas) (Cortés y Corrales, 2019).

Esta micosis es un grave problema de salud por la frecuencia con que se presenta en pacientes con algunas inmunodeficiencias, críticos o en edades extremas de la vida. Se estima que el 5 % de pacientes hospitalizados desarrollará una infección y la mitad de estos padecerá una enfermedad asociada a biopelículas. Aunque *Candida albicans* es el agente etiológico predominante de las candidiasis invasoras se observa un cambio en la frecuencia con que otras especies se identifican también como responsables de esos cuadros clínicos. Este es el caso *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* y *Candida auris*, las que por otra parte son menos sensibles a los fármacos antifúngicos (Quindós *et al.*, 2019).

A nivel mundial se observa un incremento de la frecuencia de una especie emergente: *C. auris*. La presencia de esta levadura se informa en Asia, Europa, Estados Unidos y Suramérica (Lockhart *et al.*, 2017). Los factores de riesgo a los que se asocian las infecciones por esta especie no parecen diferir mucho de los que se reconocen para otras especies del género pero aún no es claro por qué ésta se ha diseminado de manera tan rápida a nivel mundial (Carvajal *et al.*, 2020).

Los factores de virulencia son estructuras o productos moleculares que permiten al microorganismo sobrevivir en el interior del hospedero y provocar la infección. La virulencia no depende de una sola característica, sino de la expresión de un número crítico de factores que operan en conjunto (Bonifaz, 2015). Los principales factores asociados a la infección por *Candida* son el dimorfismo, la producción de enzimas (fosfolipasas, proteinasas, hemolisinas), los cambios fenotípicos, la capacidad de adhesión a superficies inertes o tejidos y la formación de biopelículas. Estos le posibilitan a las especies del género la invasión y colonización de los tejidos y la evasión de los mecanismos desencadenados por el sistema inmunológico del hospedero para controlar la infección (Quindós *et al.*, 2019).

Las enzimas secretadas cumplen el papel preponderante en la destrucción de las membranas de las células del epitelio, facilitan la penetración del patógeno y ocasionan graves daños en los tejidos; también son responsables de atacar a proteínas específicas del sistema inmune como inmunoglobulinas, citoquinas y proteínas del complemento (Souza *et al.*, 2013). Son varios los estudios que relacionan la capacidad de generar biopelículas de estos microorganismos con una mayor resistencia a los antifúngicos (Quindós *et al.*, 2019).

Hoy se hace necesario implementar métodos para evaluar la susceptibilidad antifúngica en la rutina de los laboratorios de micología, debido principalmente a los antecedentes de resistencia y a la introducción al arsenal terapéutico de nuevos antimicóticos.

Los estudios de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos pueden ayudar a elegir el tratamiento más adecuado o incluso a variar la estrategia terapéutica específica, aumentando la dosis del antifúngicos, cambiando de fármaco o instaurar una terapia combinada (Orellana y Pacheco, 2021).

Aunque es indudable el valor terapéutico de los antifúngicos azólicos, en los últimos años se reporta a nivel mundial un aumento en la resistencia a ketoconazol, fluconazol e itraconazol en *C. albicans*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* y *Candida krusei*. Este grupo farmacológico es muy útil en el tratamiento de enfermedades micóticas y el fluconazol es el más utilizado en el tratamiento de las candidemias (Cardenas y Pérez, 2020).

Otro de los antifúngicos que se recomienda en candidiasis invasora es el voriconazol, de amplio espectro, útil en *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*. (Quiles y García, 2021).

Las equinocandinas conforman una familia de antifúngicos que se utiliza para el tratamiento de candidiasis sistémica y son activas contra *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*. Tienen una menor actividad in vitro, aunque esta no contraindica su uso terapéutico (Quiles y García, 2021).

A pesar de la introducción de nuevos y potentes fármacos antifúngicos, como las equinocandinas y los triazoles, y de las recomendaciones actualizadas de las guías terapéuticas, la formulación liposomal de anfotericina B (APL) se utiliza en la práctica clínica de forma habitual desde su comercialización en 1991. Esto se debe a que este fármaco, después de más de 50 años de utilización clínica, mantiene intactas sus interesantes propiedades terapéuticas como son poseer el mayor espectro de acción antifúngica conocida, que incluye a los hongos filamentosos, junto con una buena tolerancia, seguridad y eficacia. A estas cualidades también se pueden añadir su reconocido efecto inmunomodulador y su interesante papel sinérgico en asociación con otros fármacos antifúngicos cuando se precisa una terapia combinada (Pemán y Quindós, 2021).

Existen varios métodos para la determinación de la susceptibilidad a levaduras, entre ellos los métodos de difusión en agar con disco, con tabletas Neo Sensitans®, ATB-Fungus®, método colorimétrico como Sensititre® Yeast One, Fungitest® y el método automatizado, Vitek 2® y el método de epsilometría de ETest®, que es una técnica cuantitativa que permite estimar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Consiste en la utilización de una tira de plástico que lleva en una de sus caras un gradiente de concentración del antimicrobiano (Sanguinetti y Posteraro, 2017). Entre los métodos estandarizados para determinar CMI in vitro a levaduras se acepta a nivel internacional el método de microdilución, descritos y normalizados por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) y el documento del EUCAST (European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing) (Castro *et al.*, 2019).

La tasa de morbilidad por candidiasis sistémica en Cuba se ha elevado en los últimos años en pacientes neonatos, pediátricos y adultos hospitalizados en salas de atención

al grave. En la provincia de Villa Clara, García y colaboradores, desarrollaron una investigación en pacientes pediátricos ingresados en el Hospital Universitario Pediátrico “José Luis Miranda” entre 2013 y 2018, con una incidencia de 50 pacientes con aislados de *Candida* en hemocultivos y predominio de *Candida* spp. En otro estudio realizado por los mismos autores entre los años 2018-2019 en cinco hospitales de la provincia se diagnostica candidiasis invasora en los tres grupos de edades, principalmente en sangre, orina y con variabilidad en las especies de *Candida* (García *et al.*, 2020).

Otro trabajo previo en el Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (LM - IPK) en el 2017, estudia factores de virulencia y susceptibilidad antifúngica a 60 aislados de *Candida* procedentes de casos de candidiasis invasora, donde se encontró diferencias significativas entre las especies de *Candida* en cuanto a la producción de enzimas y a la formación de biopelícula (García, 2017).

A la fecha, no hay datos epidemiológicos sobre candidemia ni de sus patrones de resistencia a los antifúngicos en los que se estudie en forma prospectiva, sistemática y coordinada a pacientes hospitalizados en distintos países de Latinoamérica. Además, la información que brindan los estudios realizados en otros continentes puede no ser de aplicación para Latinoamérica, si se tienen en cuenta factores tales como son la población y políticas sanitarias de la región (Cortés y Corrales, 2019).

La identificación precisa y las pruebas de susceptibilidad antifúngica de *Candida* spp. siguen siendo un gran desafío para la mayoría de los laboratorios en el país. La identificación presenta sus limitaciones, la mayoría de los laboratorios se basan en métodos fenotípicos de identificación de *Candida* que solo permiten diferenciar las especies más comunes y en las pruebas de susceptibilidad una limitación importante, es que los puntos de corte para interpretar la susceptibilidad a los antifúngicos difieren según las especies de *Candida*. Solo se han establecido puntos de corte para las especies más comunes, mientras que muchas especies carecen de puntos de corte definidos. Adicionalmente la experiencia necesaria para realizar la prueba de susceptibilidad antifúngica de referencia, microdilución en caldo, se restringe a laboratorios especializados.

La candidemia es la infección más común de enfermedad fúngica invasora. Los datos de susceptibilidad antifúngica de los aislados de *Candida* recuperados especialmente de pacientes en unidades hospitalarias de alto riesgo proporcionarán una visión general de la resistencia emergente en *Candida* spp. Por lo que se hace necesario no solo el conocimiento de la epidemiología, sino también, la continua vigilancia del laboratorio de esta infección fúngica invasora para monitorear la incidencia, caracterización de las especies y la detección de resistencia a los antifúngicos.

Esta investigación permitirá incorporar información precisa en aislados de *Candida* spp. en candidemias como parte de la vigilancia de la resistencia antimicrobiana (RAM). Por este motivo nos propusimos como objetivos:

OBJETIVOS

1. Determinar los factores de virulencia relacionados con la producción de enzimas hidrolíticas de aislados de *Candida* provenientes de candidemia.
2. Evaluar el perfil de susceptibilidad antifúngica de los aislados en estudio como parte de la vigilancia de esta micosis.

CAPITULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Definición

El término candidiasis invasora engloba un amplio espectro de enfermedades graves oportunistas, entre las cuales se incluyen: candidemia, endocarditis, meningitis, endoftalmitis y otras afectaciones de diversos órganos profundos; provocadas por levaduras del género *Candida*. Es una de las infecciones más frecuente asociadas a la asistencia sanitaria y la infección fúngica invasora (IFI) de mayor prevalencia en todo el mundo (Cortés y Corrales, 2019).

1.2. Agente etiológico

Candida es un organismo unicelular, esférico, ovoide, no encapsulado, no presenta pigmento, es un hongo dimorfo que forma pseudohifas, hifas y blastoconidias, tiene la propiedad de asimilar y fermentar azúcares (Bonifaz, 2015).

Existen más de 190 especies del género *Candida*, pero dentro de estas, se ha aislado con mayor frecuencia a *C. albicans*, la cual se considera la especie de mayor importancia médica (Bonifaz, 2015).

Estos microorganismos se encuentran formando parte de la microbiota normal de las mucosas en el hombre y se presentan desde los primeros días del nacimiento. Se les puede encontrar en mucosas de los sistemas respiratorio, digestivo y genital femenino, donde necesitan condiciones favorables para su desarrollo como patógenos *C. albicans* ha sido responsable de úlceras corneales, vulvovaginitis, onicomicosis, dermatomicosis, faringitis, estomatitis, meningitis, enterocolitis, esofagitis, septicemia, entre otros (Bonifaz, 2015).

A pesar de ser *C. albicans* la más virulenta de las especies del género, existen otras que son capaces de producir infecciones en los humanos, dentro de las que se destacan: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae*. Hace poco más de una década fue identificada la nueva especie *C. auris*, aislada en el canal auditivo de un paciente de Corea del Sur y hoy está presente en distintas regiones tales como: Japón, Venezuela, Estados Unidos, Sudáfrica, Reino Unido, España entre otros (Lockhart *et al.*, 2017). Ha

mostrado fuerte resistencia a múltiples fármacos y ha causado brotes epidémicos. Es difícil de diagnosticar y puede sobrevivir en las superficies inanimadas por largos periodos de tiempo (Carvajal *et al.*, 2020).

1.3. Taxonomía

La ubicación taxonómica del género *Candida* según Hoog *et al.*, 2011 es:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Ascomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: *Saccharomycetaceae*

Género: *Candida*

La taxonomía de las especies de *Candida* patógenas tuvo cambios importantes debido a la descripción de nuevas especies relacionadas (especies crípticas) mediante el uso de técnicas moleculares. Se denomina complejo de especies a 2 o más especies con características fenotípicas similares, que genéticamente están emparentadas, pero son diferentes (Criseo *et al.*, 2015).

Los complejos de especies crípticas reconocidos en la actualidad son los siguientes: complejo *C. albicans* (*C. albicans* – *C. dubliniensis* – *C. africana*), complejo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis sensu stricto* – *C. metapsilosis* – *C. orthopsilosis*) y complejo *C. glabrata* (*C. glabrata* – *C. bracarensis* – *C. nivariensis*) (Criseo *et al.*, 2015).

1.4. Patogenia

Las especies de *Candida* colonizan las mucosas gastrointestinal, genitourinaria y respiratoria, así como la piel. El aislamiento de este microorganismo en estas localizaciones no implica siempre la presencia de infección. La transición entre la colonización y la invasión de mucosas o la diseminación de la infección depende

mayoritariamente de la respuesta que sea capaz de ofrecer el huésped frente al hongo y la expresión por parte del hongo de una serie de atributos patogénicos o factores de virulencia que contribuyen a mediar la adherencia e invasión de los tejidos y la obtención de nutrientes (Vigazzi *et al.*, 2021).

Numerosos son los mecanismos que despliega la inmunidad del hospedero frente a una infección por *Candida*. La secreción de enzimas como mucinas, lisozimas, lacto peroxidasas e inmunoglobulina A y la producción de citoquinas pro-inflamatorias como la interleuquina 8 (IL-8) son los principales mecanismos de defensa de las células epiteliales ante este patógeno. Una vez superadas las barreras epiteliales, el microorganismo se enfrenta a los mediadores pro-inflamatorios y defensinas (péptidos antimicrobianos) secretados por el endotelio vascular con el objetivo de estimular la activación y reclutamiento de neutrófilos y monocitos (Amezcuza *et al.*, 2018).

Los receptores reconocedores de patrones (RRP) más importantes en la opsonización de las células de *Candida* por neutrófilos y monocitos son los TLR (del inglés *Toll like receptors*), los receptores de manosa y la dectina-1 (Tapia y Alburquerque, 2013). Los factores humorales también participan en la defensa del hospedero frente a *Candida*. La infección por esta levadura activa el complemento por la vía clásica y la alternativa. Esto facilita la activación y el reclutamiento de más células fagocíticas aumentando la intensidad de la respuesta inmune. La consecuencia final de esta red de procesos es la activación de una u otra respuesta inmunitaria adaptativa y una serie de eventos dirigidos a la eliminación de *Candida* del organismo, entre los que destacan la generación de radicales libres de oxígeno y nitrógeno (Vigazzi *et al.*, 2021).

1.5. Factores de virulencia

La presencia de diversos factores de virulencia hace que los microorganismos logren vencer las defensas del hospedero garantizando el desarrollo de la enfermedad. En el género *Candida*, los de mayor importancia por el papel que desempeñan en la patogénesis de la infección son: el dimorfismo, el cambio fenotípico, la producción de enzimas (fosfolipasas, proteinasas, hemolisinas, etc.), la capacidad de adherirse a superficies inertes o tejidos y la formación de biopelículas. Ellos garantizan la invasión y

colonización de los tejidos y la evasión de los mecanismos desencadenados por el sistema inmunológico (Nouraei *et al.*, 2020).

1.5.1. Dimorfismo

C. albicans es un hongo polimórfico que logra crecer tanto como células ovoides levaduriformes, células elipsoidales elongadas que muestran una constricción en el sitio de origen (pseudohifas) o como hifas verdaderas de paredes paralelas. La capacidad de adoptar diferentes morfologías se llama dimorfismo; atributo patogénico de mayor relevancia para este género, puesto que se necesitan de ambas formas (levadura e hifa) para que el establecimiento de este microorganismo sea efectivo (Mitchell, 1998). Las hifas tienen un mayor potencial invasor lo que se evidencia en cepas mutantes de *C. albicans*, que ante la incapacidad de cambiar de estado levaduriforme a filamentoso, se detectan deficiencias en el proceso de infección (Jacobsen *et al.*, 2012).

La morfología de *C. albicans* está sujeta a diversas regulaciones que se vinculan a los factores ambientales. Por ejemplo, los cambios de pH; valores inferiores a seis propician el crecimiento en forma levaduriforme, en tanto los superiores a siete favorecen la producción de hifas. Otros elementos que estimulan la formación de filamentos son: disponibilidad de nutrientes, presencia de suero o N-acetilglucosamina, temperatura de 37°C y presencia de CO₂ (Vieille, 2022).

1.5.2. Adherencia

La adherencia les garantiza a las levaduras de *Candida* la interacción con las células de los tejidos diana; esta es llevada a cabo por la presencia de adhesinas en su pared celular. Estas moléculas de naturaleza glicoproteica o polisacáridica, tienen sus receptores en las mucosas gastrointestinales, vaginales, orales. Dentro de este grupo se encuentran las familias Als (del inglés *agglutinin like sequences*) y Epa (del inglés *epithelial adhesin*), Hwp1p (del inglés *hyphal cell wall protein 1*) e Int1p (del inglés *integrin like receptors*) (Mohammadi *et al.*, 2020).

1.5.3. Biopelículas

La capacidad de *Candida* de asociarse a superficies vivas o inertes dando lugar a una comunidad o ecosistema microbiano organizado se denomina biopelícula. Esto se debe a la secreción de un exopolímero compuesto de glicocálix que forma una matriz adherente donde estos microorganismos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos (Nouraei *et al.*, 2020).

Entre las características de las biopelículas se encuentran la adherencia y la heterogeneidad las cuales le proporcionan una mayor resistencia ante las defensas del hospedero (Gil *et al.*, 2017). *Candida* es capaz de formar biopelículas en los dispositivos médicos como: implantes de catéteres intravasculares o urinarios, tubos endotraqueales, válvulas cardíacas, marcapasos, reemplazos de articulaciones (cadera o rodilla) y anticonceptivos intrauterinos. *C. albicans* es la especie con mayor capacidad para formar biopelículas, lo que contribuye a incrementar su potencial patogénico en relación a otras especies como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. kefyr* (Quindós *et al.*, 2019).

1.5.4. Cambio fenotípico

El primer reporte de un cambio fenotípico en *C. albicans* fue en 1985, donde se observó que las células sufrían transiciones morfológicas espontáneas reversibles. Posteriormente se demostró que esta capacidad también la poseían otras especies del género. Además de las modificaciones en la macromorfología colonial (colonias lisas, rugosas), se describen cambios en la antigenicidad, como aumento o disminución en la producción de enzimas y toxinas. Estos fenómenos son una estrategia del agente frente a las diferentes células que ataca (Bonifaz, 2015).

1.5.5. Hidrofobicidad a la superficie celular

Dentro de las potencialidades del género *Candida* está la hidrofobicidad a la superficie celular, característica principal de su pared, que constituye una fuerte herramienta para propiciar la adherencia y formación de biopelículas. Las especies hidrofóbicas tienen mayor capacidad de unirse a proteínas que aquellas que son hidrofílicas, lo que

constituye una muestra del papel que juega dicha propiedad en la capacidad infectiva (Eraso y Ríos, 2016).

1.5.6. Enzimas

La producción de enzimas hidrolíticas extracelulares es un factor de virulencia del género *Candida* de gran importancia en la invasión y colonización de los tejidos. Entre las principales se describen las proteasas, las fosfolipasas y las hemolisinas (Nouraeia *et al.*, 2020)

1.5.6.1. Proteasas

Las proteasas se encuentran incluidas en un grupo amplio de enzimas proteolíticas, las cuales son capaces de catalizar la escisión de los enlaces peptídicos en las proteínas favoreciendo la reducción de estas a aminoácidos libres (Czechowicz *et al.*, 2022). Las principales enzimas que produce el género *Candida* son las proteasas aspárticas secretadas (Saps, del inglés *secreted aspartyl proteinases*). Dentro de sus funciones más importantes en el proceso infeccioso del hongo se encuentran: disrupción de las membranas del hospedero mediándola invasión a los tejidos, la digestión de proteínas para obtener nutrientes, adherencia y la evasión del sistema inmunológico degradando inmunoglobulinas como la IgA (la más frecuente en las membranas mucosas) y las proteínas del complemento (Souza *et al.*, 2013).

1.5.6.2. Fosfolipasas

Las enzimas fosfolipasas (PLs) pertenecen a un grupo heterogéneo; según el enlace específico que hidrolizan en la molécula de fosfolípido se ubican en un grupo u otro (A, B, C y D). Poseen la facultad de hidrolizar uno o más enlaces éster específicos en glicerofosfolípidos. Ellas juegan un papel importante en la patogénesis ya que provocan alteraciones en la superficie celular del hospedero, esto contribuye a la adherencia, penetración del patógeno y posterior colonización de los tejidos (Souza *et al.*, 2013).

1.5.6.3. Hemolisinas

A pesar de que las hemolisinas existen en pequeñas cantidades en los seres vivos, su papel es vital en el crecimiento y en la supervivencia de los mismos; son necesarias no

solo para lograr una adecuada oxigenación tisular sino también para el metabolismo de la mayor parte de las células. Se conoce que la capacidad de un microorganismo patógeno de adquirir hierro del hospedero es de gran utilidad para el establecimiento de una infección (Alvarado, 2021).

1.6. Epidemiología

Las infecciones por *Candida* spp. constituyen la cuarta causa de infecciones del torrente sanguíneo de origen nosocomial y presentan una elevada mortalidad (30-50%). La especie más frecuente aislada es *C. albicans*, sin embargo, en la última década se observa un aumento de otras especies de "*Candida* no *albicans*". Algunos autores apuntan que el agente causal puede variar según la geografía, circunstancias de gravedad del paciente y las unidades de hospitalización de acogida (Muango *et al.*, 2017).

Existen una serie de factores de riesgo para su desarrollo, comunes en la mayoría de los pacientes en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), entre los que se encuentran: catéteres venosos centrales, nutrición parenteral que permiten el acceso directo del hongo al torrente sanguíneo, la aplicación de antibacterianos de amplio espectro, que permiten el crecimiento excesivo de hongos y trauma o cirugía gastrointestinal, que interrumpe las barreras de las mucosas. Hay evidencias de transmisión horizontal de levaduras intrahospitalarias y se relaciona con las manos del personal de la salud. Estudios demuestran que la presencia de levaduras en las manos de personas sanas es inferior a 5%, sin embargo, en trabajadores de la salud puede variar entre 20% en el personal médico y 80% en el de enfermería (Muango *et al.*, 2017).

La prevención mediante la utilización de antifúngicos antes de que aparezca la infección no es una buena alternativa, además puede dificultar el diagnóstico y alterar la microbiota que protege de la colonización en desequilibrio de patógenos. Es por ello que las medidas con mayor evidencia científica pasan por la detección de pacientes de mayor riesgo, conocimiento de la epidemiología patógena, la actuación en el entorno y la buena práctica profesional (Víchez *et al.*, 2017).

1.7. Formas clínicas

Las formas clínicas causadas por estos microorganismos son variadas y pueden manifestarse desde infecciones superficiales en la piel y las mucosas, hasta candidiasis sistémica.

1.7.1. Candidiasis invasora

Las principales rutas de invasión de las levaduras son vía catéteres endovenosos (involucra a las especies que colonizan la piel de enfermos y/o a las que colonizan principalmente las manos del personal hospitalario) y por penetración a través de la mucosa intestinal (involucra a las especies que colonizan previamente el tracto gastrointestinal). La frecuencia de la candidiasis invasora (CI) ha aumentado dramáticamente en los últimos años. Estas infecciones están asociadas con una alta mortalidad, por lo tanto es vital un diagnóstico temprano y específico. La decisión de tratar esta infección está basada en la información clínica y micológica (Lazo *et al.*, 2018).

Candidemia: consiste en el hallazgo del hongo en muestras de hemocultivo, sin cambios inmunológicos en el huésped y en ausencia de compromiso visceral demostrable, exceptuando la localización cutáneo-mucosa. Puede ser transitoria (hemocultivo positivo aislado) o persistente (hemocultivos positivos reiterados). En la mayoría de los casos la desaparición de la fungemia se obtiene retirando el catéter y si el paciente no presenta factores de inmunosupresión asociados, no es necesario indicar antimicóticos sistémicos. La candidemia en inmunosuprimidos, en particular neutropénicos, siempre debe considerarse como infección sistémica, potencialmente grave, el riesgo de muerte es elevado y los procedimientos de laboratorio para el diagnóstico son lentos, debiéndose indicar en todos los casos tratamiento específico. Es más frecuente en pacientes con enfermedades hematológicas malignas y en patologías o cirugías que involucran el tracto gastrointestinal (Lazo *et al.*, 2018).

1.7.2. Factores de Riesgos

Los factores de riesgo asociados a infecciones invasoras por *Candida* se pueden dividir en dos grandes grupos: los relacionados a la atención en salud como uso de catéteres,

nutrición parenteral total, intervenciones quirúrgicas y uso de drogas antimicrobianas y los asociados al estado del paciente como edad, enfermedades inmunosupresoras, deterioro clínico y comorbilidades (Lona *et al.*, 2021).

1.8. Diagnóstico de Laboratorio.

El éxito de un diagnóstico está asociado al uso complementario de técnicas tanto convencionales como de métodos modernos como herramientas moleculares o el uso de espectrometría de masas.

Las especies de *Candida* distintas de *Candida albicans* se recuperan cada vez con más frecuencia y pueden presentar patrones variables de sensibilidad a los antifúngicos, por lo que es muy importante identificarlas correctamente. Los métodos de identificación convencionales incluyen estudios micromorfológicos, medios cromogénicos y sistemas comerciales basados en pruebas bioquímicas. Estos presentan inconvenientes, tales como un tiempo de identificación prolongado, bases de datos limitadas e identificaciones incorrectas (Maldonado *et al.*, 2018).

En pacientes críticos, la candidemia y la candidiasis invasora empeoran de manera importante el pronóstico de los mismos. A pesar del desarrollo de nuevos antifúngicos, pueden llegar a alcanzar una mortalidad entorno al 47%. Por ello, la detección rápida de estas infecciones, mediante la aplicación de diversas estrategias, constituye un elemento clave para instaurar un tratamiento precoz y adecuado (Almirante *et al.*, 2017).

Para el diagnóstico de candidiasis invasora, el hemocultivo es el mejor método disponible, pero es un procedimiento que requiere mucho tiempo y esto puede afectar el momento de inicio de la terapia. Existen métodos automatizados que constituyen la mejor opción. Dentro de ellos se pueden citar: BacT/ALERT, BACTEC (Colombo *et al.*, 2017).

Actualmente las pruebas serológicas juegan un rol importante, entre ellas la detección de marcadores biológicos como 1-3-D glucano, el manano y anticuerpos anti-mananos. Estudios han demostrado una sensibilidad y especificidad superior a los hemocultivos. Estos ensayos tienen un alto valor predictivo negativo, la repetición de

las pruebas con resultados negativos ayuda a descartar la candidemia (García y Pemán, 2018).

También se desarrolló un ELISA para la detección de un antígeno de 65 KDa producido por *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. En el estudio realizado para su validación esta nueva prueba diagnóstica detectó el antígeno 65 KDa en el 80% de los pacientes con candidemia (Fuentes *et al.*, 2020).

Otras técnicas no convencionales son las dirigidas para detectar anticuerpos de líquidos corporales Platelia *Candida* Ab/Ac/AK (Bio-Rad, Francia) el cual detecta anti-manano de *Candida*, anticuerpos que aparecen antes de las manifestaciones clínicas y se asocian a un riesgo mayor de candidiasis invasora en pacientes neutropénicos; presentan una sensibilidad y especificidad de 50% y 94% respectivamente. Su utilización simultánea con el Platelia Ag (Bio-Rad, Francia) aumenta la sensibilidad del diagnóstico a un 80 % sin embargo, por la alta prevalencia de anticuerpo anti-mananos en la población, se investigan otros marcadores más específicos de candidiasis invasora como los dirigidos contra antígenos citoplasmáticos y los expresados en la fase micelial de *C. albicans* (Fuentes *et al.*, 2020).

La detección de anticuerpos anti-micelio o anti-tubo germinativo se comercializa en forma de inmunofluorescencia indirecta (IFI) *Candida albicans* IFA IgG (Laboratorio Vircell, España). La técnica presenta buena sensibilidad de 84% -87% y especificidad de 94,7% -95%) para el diagnóstico de la infección sistémica de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parasilopsis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. dubliniensis*. Permite distinguir entre candidiasis transitoria o relacionada con catéter y la candidemia asociada a infecciones profundas. Además, permite el seguimiento evolutivo de la infección al detectar cantidades decrecientes de los anticuerpos en los pacientes que responden al tratamiento (Fuentes *et al.*, 2020).

La reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR, siglas en inglés) es un método alternativo más rápido y preciso que el hemocultivo para detectar especies de *Candida* en sangre y también en muestras de biopsias en pacientes con candidiasis invasora. Se ha mejorado la sensibilidad de estas pruebas PCR con el uso de muestras de suero y plasma en comparación con sangre total. En estudios

realizados en un 25 % de la muestra de sangre total no se obtuvo ADN fúngico al mismo tiempo que las muestras de hemocultivo positivas (Colombo *et al.*, 2017).

Otras técnicas eficientes son las basadas en espectrometría de masas MALDI- TOF de la marca Bio-typer (BrukerDaltonic) y PCR (amplificación de la región ITS1, ITS2) o de la región D1/D2 O ITS, método considerado como el *gold standard* para la identificación de *C. auris* (Carvajal *et al.*, 2020).

1.9. Pruebas de susceptibilidad in vitro.

Las infecciones fúngicas representan un serio problema de salud pública, incluyendo aquellas producidas por hongos que pueden ser resistentes o multirresistentes a los antifúngicos. La información sobre la sensibilidad de estos microorganismos a los distintos antifúngicos debe ser analizada para ayudar a los profesionales clínicos a instaurar un tratamiento adecuado (Sanguinetti y Posteraro, 2017).

Los objetivos de la realización del antifungigrama son: conocer la actividad in vitro de los antifúngicos; pronosticar el resultado terapéutico de determinado tratamiento antifúngico; detectar la aparición de cepas resistentes dentro de la población sensible; correlacionar la actividad in vitro con los resultados in vivo, y determinar la utilidad terapéutica de los nuevos antifúngicos (Castro *et al.*, 2019).

Para conseguir estos objetivos, se necesitan métodos reproducibles que permitan el estudio de la sensibilidad y disponer de puntos de corte clínicos para la interpretación de sus resultados.

En la actualidad se dispone de métodos de referencia desarrollados por el CLSI y por el EUCAST los cuales, aunque laboriosos, permiten determinar la sensibilidad a los antifúngicos de levaduras y hongos filamentosos (Castro *et al.*, 2019).

1.9.1. Métodos usados para el estudio de la susceptibilidad antifúngica in vitro.

. El CLSI ha estandarizado 2 métodos para determinar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos:

- El método de microdilución en caldo para levaduras (documentos M27-A4, M60, M57 y M59)
- El método de difusión en agar para levaduras (documentos M44-A2 y M60)

El EUCAST también ha estandarizado un método de microdilución para levaduras (documento E.DEF 7.3.1).

Los métodos CLSI y EUCAST son similares, pero presentan ciertas diferencias metodológicas en relación con la concentración de glucosa del medio de cultivo, forma del fondo de la microplaca, inóculo (más elevado en el caso del EUCAST), tipo de lectura y tiempo de incubación, pero los resultados obtenidos por ambos métodos son similares (Castro *et al.*, 2019).

- Los métodos de dilución estandarizados son muy laboriosos y lentos para ser utilizados en la práctica diaria del laboratorio, unido a la imposibilidad de que estos métodos puedan ser útiles para la determinación de sensibilidad a todos los antifúngicos y a todos los microorganismos, se han desarrollado métodos comerciales más sencillos:
- Método colorimétrico (SensititreYeastOne®, ThermoScientific, Estados Unidos): es un método colorimétrico basado en la metodología de microdilución del CLSI. Está aprobado para estudios de sensibilidad in vitro de levaduras a fluconazol, itraconazol, voriconazol, 5-fluorocitosina y caspofungina (Castro *et al.*, 2019).
- Vitek 2® (bioMérieux, Francia): es un método basado también en la metodología de la microdilución del CLSI. Incluye 6 antifúngicos, de los cuales se han aprobado para diagnóstico solo fluconazol, voriconazol y caspofungina (Siqueira *et al.*, 2018).
- Métodos de difusión en agar: Neo-sensitabs® (Rosco Laboratory, Dinamarca): son tabletas que incluyen prácticamente todos los antifúngicos, incluidos los tópicos y los sistémicos (Castro *et al.*, 2019).
- Etest® (bioMérieux, Francia) y otras tiras de gradiente de difusión MIC Test Strips® (Liofilchem, Werfen, España): es un método de difusión en agar basado en el uso de unas tiras de papel impregnadas con un gradiente de concentración de antifúngico (Castro *et al.*, 2019).

Se están desarrollando nuevas herramientas con un futuro esperanzador para el estudio de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos, principalmente orientadas a la metodología proteómica (MALDI-TOF MS) y al campo de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Hay estudios recientes que sugieren que MALDI-TOF MS puede ser utilizado para la detección de resistencias a antifúngicos en levaduras. Sin embargo, otros no lo recomiendan por no aportar mejoras respecto a los métodos de sensibilidad convencionales y no reducir el tiempo de respuesta (Castro *et al.*, 2019).

Los métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos permiten la detección de mutaciones de genes relacionadas con la resistencia a antifúngicos. En el caso de los azoles y levaduras, los genes son MDR o CDR y ERGU; en cuanto a la resistencia a equinocandinas, las mutaciones se encuentran en genes FKS y FKS1 para todas las especies de *Candida*, y el gen KFS2 para *C. glabrata* (Castro *et al.*, 2019).

1.10. Tratamiento

Las infecciones fúngicas invasoras están asociadas a 1,5 millones de muertes cada año y están relacionadas con pacientes que tienen alterado su sistema inmunitario por tratamientos con quimioterapia, uso de corticoides, recepción de un trasplante o infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Las especies de *Candida* se encuentran entre los principales responsables de estas infecciones. El arsenal terapéutico contra estas micosis es bastante limitado, por el restringido número de alternativas terapéuticas disponibles. Solo existen cuatro familias de fármacos antifúngicos utilizados en el tratamiento de las infecciones sistémica que pueden ser administrados por vía oral o intravenosa: polienos, azoles, equinocandinas y los análogos de la pirimidina (Quiles *et al.*, 2021).

Los polienos son macrólidos, su principal mecanismo de acción se ejerce mediante la unión a los esteroides de la membrana fúngica, al ergosterol. Esta unión genera la formación de canales por los que la célula fúngica pierde contenido citoplasmático, lo que conlleva un daño oxidativo y la muerte celular. Recientemente, se ha descrito un nuevo mecanismo de acción mediante el cual la anfotericina B (AP) actúa como una esponja que extrae el ergosterol de la membrana, lo que provoca la inestabilidad de

esta. Estos fármacos fungicidas presentan uno de los espectros de actividad más amplios; en el caso de las micosis sistémicas solo se utiliza AP (Cho *et al.*, 2015).

Los azoles son moléculas sintéticas con un anillo heterocíclico unido a una cadena alifática con un grupo fenilo. Según los átomos de nitrógeno que contiene el anillo azólico, existen dos familias: los imidazoles que poseen dos átomos de nitrógeno (clotrimazol, ketoconazol y miconazol) y los triazoles, con tres átomos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol). Estos antifúngicos bloquean la síntesis del ergosterol al inhibir la enzima C14- esterol desmetilasa. Los triazoles presentan más afinidad por las membranas de las células fúngicas y menos toxicidad. El fluconazol muestra muy buena actividad contra levaduras del género *Candida*. Hay que destacar que algunas levaduras como *C. glabrata* y *C. guilliermondii* presentan valores de CMI elevados y que el fluconazol no tiene actividad contra *C. auris* (Colombo *et al.*, 2017).

Las equinocandinas son una clase de lipopéptidos semisintéticos cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la enzima 1, 3--D-glucano sintasa, responsable de la síntesis de 1,3--D-glucano, polisacárido esencial de la pared celular de muchos hongos. Estos fármacos antifúngicos son fungicidas contra *Candida*. Existen tres equinocandinas aprobadas para uso clínico: la caspofungina, la micafungina y la anidulafungina. Las tres equinocandinas tienen un patrón similar de actividad antifúngica y son activas contra especies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y tienen una menor actividad *in vitro* frente a *C. guilliermondii* (los valores de CMI son más elevados) aunque esta circunstancia no contraindica su uso terapéutico (Quiles *et al.*, 2021.).

El desarrollo de resistencias se ha asociado con exposiciones a estos fármacos antifúngicos y se originan por mutaciones puntuales dentro de regiones conservadas de los genes FKS1 y FKS2, que codifican subunidades de la enzima glucano sintasa. En general, las tasas de resistencia de *C. albicans* y otras especies siguen siendo bajas (1 a 3%). Sin embargo, en algunos estudios se han observado porcentajes de resistencia más elevados en *C. tropicalis*, *C. auris* y *C. glabrata*, llegando al 15% en esta última especie e incluso describiéndose cepas multirresistentes con resistencia a azoles, candinas y en algunos casos, a polienos (Arendrup *et al.*, 2017).

1.10.1. Nuevos fármacos antifúngicos

La rezafungina es una nueva equinocandina con el mismo mecanismo de acción que estas. Muestra *in vitro* una potencia mejorada, con valores de CMI más bajos contra *C. auris*. Sin embargo, su mayor ventaja radica en su farmacocinética, con una vida media muy prolongada que permite su utilización en intervalos de dosificación semanales. Dirigida a la profilaxis de las micosis por *Candida* (Sandison *et al.*, 2017).

El fosmanogepix, inaugura una nueva familia de fármacos antifúngicos responsable de la síntesis del glicosilfosfatidilinositol que sirve de anclaje de muchas manoproteínas a la pared celular. Estas manoproteínas tienen diversas funciones como la señalización, la adhesión celular, el metabolismo de la pared celular y la respuesta inmunitaria. Tiene actividad contra levaduras del género *Candida* resistentes a azoles y equinocandinas (Alkhazraji *et al.*, 2020).

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de la actividad enzimática hidrolítica y la susceptibilidad a tres antifúngicos de aislados sistémica de *Candida* en 2022. El procesamiento se ejecutó en el Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (LM - IPK).

2.2 Muestra de estudio

La muestra de estudio quedó conformada por la totalidad de aislados (58) obtenidos de pacientes con candidemia durante el periodo 2018-2019. Estos se encontraban conservados en la colección de levaduras del LM - IPK, en viales de 1,5 mL con agua destilada estéril.

Tabla 1. Distribución de los aislados de *Candida* según su especie.

Especies	Número de aislados
<i>C. albicans</i>	24
<i>C. parapsilosis</i>	16
<i>C. tropicalis</i>	11
<i>C. lusitaniae</i>	3
<i>C. glabrata</i>	2
<i>C. guilliermondii</i>	2
Total	58

Se les corroboró su viabilidad y pureza para su posterior re-identificación. Los viales se agitaron en vórtex (AG220, Gallenkamp, Inglaterra) para homogeneizar su contenido, se sembraron 100 µL de la suspensión en agar Sabouraud cloranfenicol (SCL) y se incubaron a 37°C durante 48-72 horas.

2.2.1 Identificación de los aislados:

Se hizo una nueva identificación para certificar que no existió contaminación durante el tiempo de conservación, para esto se siguió la metodología establecida en el Laboratorio de Micología del IPK:

2.2.1.1 Pruebas morfológicas.

Se realizó un examen macroscópico de las colonias para observar el color, la textura y las características del borde y superficie de las mismas. A todos los aislados se les realizaron las pruebas de formación de tubos germinativos y la filamentación en agar harina de maíz-Tween 80 (McGinnis, 1980). Se utilizó la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 como control de identificación.

Para los aislados que no se identificaron como *C. albicans* mediante las pruebas de tubos germinativos y filamentación, se empleó el sistema estandarizado API 20C AUX siguiendo las instrucciones del fabricante (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia). Se utilizó la cepa *Candida parapsilosis* ATCC 22019 como control de identificación.

2.3 Determinación de factores de virulencia.

2.3.1 Producción de enzimas.

2.3.1.1 Actividad fosfolipasa.

La actividad fosfolipasa se evaluó de acuerdo al método de Marcos-Arias *et al.* (2009) en agar malta suplementado con yema de huevo. Para la preparación del medio se usaron 22,5 g de agar malta (BIOCEN, Cuba), 29,2 g de NaCl (OXOID, Reino Unido) y 0,28 g CaCl₂ (Merck, Alemania) disueltos en 490 mL de agua destilada. Luego se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, una vez atemperado (50 - 55 °C) se agregaron 10 mL de una emulsión de yema de huevo estéril (50 % agua destilada estéril - 50 % yema de huevo) y se distribuyó en placas de Petri de 90 mm de diámetro.

Posteriormente, se preparó una suspensión de cada aislado en solución salina estéril (SSE) y se ajustó la concentración hasta obtener una densidad equivalente a 1 en la escala de MacFarland (3×10^8 UFC/mL). Luego se dispensaron 5 µL de cada una sobre la superficie del agar. Las placas se incubaron a 37 °C durante seis días.

Interpretación: un halo de precipitación alrededor del área de crecimiento fue evidencia de una actividad fosfolipasa positiva. Los resultados se expresaron mediante el índice Pz que indica la relación entre el diámetro de la colonia y el diámetro en mm de la colonia más el halo de precipitación. Los aislados se clasificaron como no productores ($Pz=1$), productores moderados ($0,99 \leq Pz \leq 0,64$) y fuertes productores ($Pz \leq 0,63$) (Price *et al.*, 1982). Se realizaron dos réplicas por aislado; el índice de actividad enzimática se reportó como la media aritmética de los dos valores. *C. albicans* ATCC 10231 se utilizó como control positivo. (anexo 2).

2.3.1.2 Actividad proteasa

La evaluación de la actividad proteasa se efectuó según la metodología descrita por Ge *et al.* (2011). El medio que se empleó contenía 11,7 g de base de carbono para levaduras, 0,01% extracto de levadura y 0,2% de albúmina sérica bovina como fuente de nitrógeno. Se ajustó el pH a 5 en 200 mL de agua destilada estéril. Una vez esterilizado por filtración se le añadió 500 mL de agua destilada estéril conteniendo un 3% de agar. Se inoculó 5 µL de una suspensión de cada aislado ajustada a 1 en la escala de turbidez de MacFarland (3×10^8 céls/mL) y se incubaron a 37°C durante 5 días. Se tomó como actividad proteasa positiva la presencia de un halo de precipitación alrededor de la colonia inoculada producto de la degradación de la albúmina sérica bovina. La actividad enzimática se expresó como el diámetro en mm del halo de precipitación, y los aislados se clasificaron como no productores (-) cuando el halo no sea visible, productores moderados (+) cuando el diámetro del halo sea de 1-2 mm y como altos productores (++) cuando sea mayor de 2 mm (Marcos-Arias *et al.*, 2009). Se realizaron dos réplicas por aislado y el índice de actividad fue la media aritmética de ambos valores. (anexo 2).

Para facilitar la comprensión de los resultados de la actividad enzimática, se unificaron en la categoría denominada productores todos los aislados clasificados como fuertes y moderados productores.

2.4 Pruebas de susceptibilidad antifúngica ETest

Se utilizó el método comercial E test®, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para esta prueba se emplearon tiras plásticas de anfotericina B (AP), fluconazol (FL) (Liofilchem), itraconazol(IT) (Biomérieux) con concentraciones de 0,002 a 32 µg/mL, en el medio RPMI 1640 suplementado con 0,165 MOPS, glucosa al 2% y Bacto-agar. El inóculo se ajustó a la escala 0,5 Mc Farland y se distribuyó uniformemente sobre la superficie de la placa con un hisopo estéril. Se colocaron las tiras y se incubaron a 37°C por 48 horas. Se realizó la lectura de las CMI. La CMI se determinó como la concentración menor en la que el borde de la zona de inhibición de la elipse se intercepta con la escala de la tira.

Siguiendo la recomendación de expertos y de los documentos que norman la realización de estudios de susceptibilidad in vitro, el sistema Etest® fue validado en nuestras condiciones, utilizando como control de calidad interno, las cepas de referencia *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 para las que se obtuvieron valores de CMI de los diferentes antifúngicos según lo establecido (CLSI, 2008; CLSI, 2020) (anexo 1).

Los puntos de corte utilizados y la categorización de los aislados en susceptible, susceptible dosis dependiente y resistente fueron los publicados por el fabricante y los contenidos en los documentos M60 (CLSI, 2020) para el FL (Tabla 2) y para la AP, IT el M27-A3 (CLSI, 2008) (Tabla 3) (anexo 3).

Tabla 2. Puntos de corte de CMI ($\mu\text{g/ml}$) para fluconazol por especies según el documento M60 (CLSI, 2020).

CMI ($\mu\text{g/ml}$)				
Especies	Sensible	S-DD	Intermedio	Resistente
<i>C. albicans</i>	≤ 2	4	4	≥ 8
<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	4	-	≥ 8
<i>C. tropicalis</i>	≤ 2	4	-	≥ 8
<i>C. lusitaniae</i>			-	
<i>C. glabrata</i>		≤ 32	-	≥ 64
<i>C. guilliermondii</i>			-	

Tabla 3. Puntos de corte de CMI ($\mu\text{g/ml}$) para los antifúngicos que se evaluaron según el documento M27-A3 (CLSI, 2008).

CMI ($\mu\text{g/ml}$)				
Antifúngicos	Sensible	S-DD	Intermedio	Resistente
Anfotericina B	≤ 1	-	-	≥ 2
Itraconazol	$\leq 0,12$	0,25-0,5	-	≥ 1

2.5 Análisis estadístico

Los datos se introdujeron en una base elaborada a su efecto en el programa Microsoft Excel. La información se procesó empleando el Sistema Operativo de Windows 10. Los resultados se vaciaron en tablas y gráficos realizados en Excel y los textos mediante Word, ambos del Microsoft Office 2016.

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de los datos. Las variables cualitativas se resumen con porcentajes. Los resultados se muestran en tablas de frecuencias y gráficos.

2.6 Aspectos éticos

La presente investigación corresponde a una tarea de un proyecto institucional “Susceptibilidad a antifúngicos y factores de virulencia de aislados clínicos de *Candida* spp.” (2018-2021) (código 18012), con la aprobación del Comité de Ética del IPK y de la Comisión Científica Especializada de Microbiología. Se trabajó con aislados pertenecientes a la Micoteca del LM – IPK. Los mismos se obtuvieron entre el 2018 y el 2021 durante el trabajo de identificación de cultivos procedentes de la red nacional de laboratorios. Teniendo en cuenta las normas éticas (Declaración de Helsinki) fue eludible la disposición de un consentimiento informado en este tipo de estudio.

Referente a las normas de bioseguridad, se consideró el grupo de riesgo de estos microorganismos (grupo de riesgo 2) y en consecuencia se realizaron las técnicas en cabina de seguridad biológica de nivel 2. Se cumplió en todo momento las normas estipuladas, esto impidió que se liberaran al exterior microorganismos patógenos por lo que este estudio no representó riesgos para la comunidad donde se encuentra el laboratorio y utilizó la metodología de trabajo de la misma.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1 Actividad enzimática

Se confirmó la identidad de los aislados. De los 58 aislados de *Candida* spp. 42(72,41%) presentaron actividad de proteasas, 13 (22,41%) presentaron actividad de fosfolipasa y producción de ambas enzimas, 11 (18,96%) (Fig. 1). Solo 14 aislados no presentaron actividad enzimática que representa el 24,13% del total.

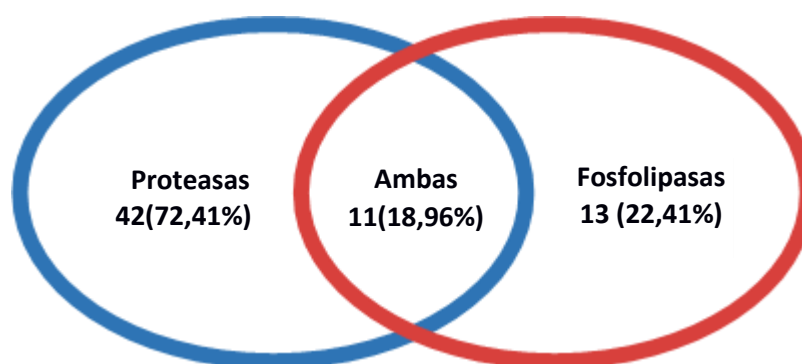


Figura 1: Aislados de *Candida* productores de fosfolipasas y proteasas

En la figura 2 se muestran los porcentajes de la actividad enzimática de los aislados de *Candida*. No existe diferencia en la producción de fosfolipasas entre *C. albicans* y *C. no albicans*. La producción de proteasas fue mayor en los aislados de *C. albicans* (83,33 %).

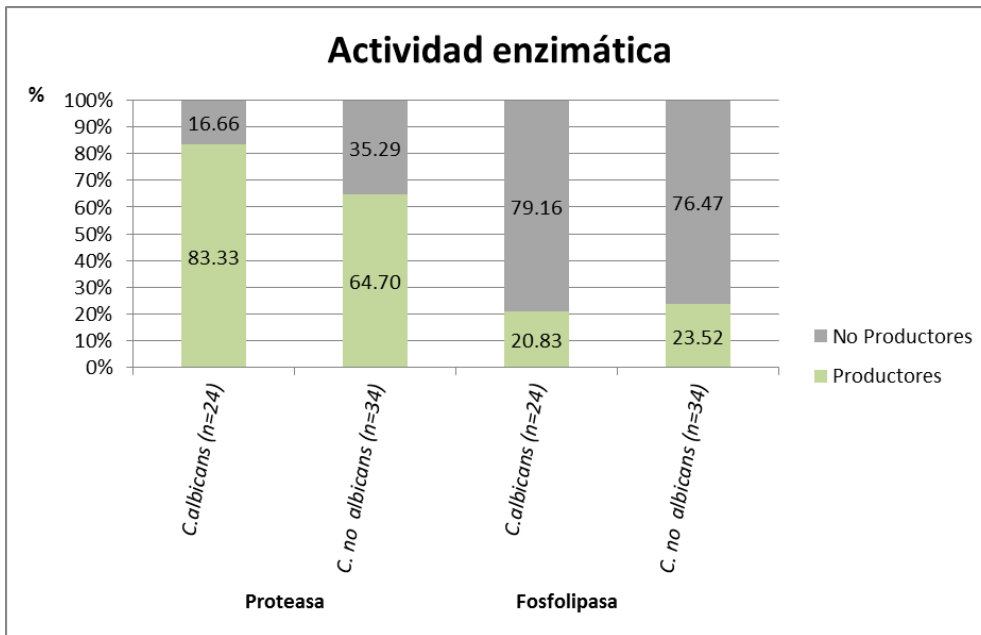


Figura 2: Porcentajes de la distribución de *C. albicans* y *C. no albicans* según la producción de proteasas y fosfolipasas.

La figura 3 muestra la relación entre las especies incluidas en el estudio y la actividad enzimática de proteasa. Los aislados de *C. albicans* que presentaron dicha actividad fueron 20(83,33%), *C. parapsilosis* 9(56,25%), *C. tropicalis* 8 (72,72%), dos *C. lusitaniae* (66,67%) y una *C. glabrata* (50%). Los 2 aislados de *C. guilliermondii* resultaron ser productores de esta enzima.

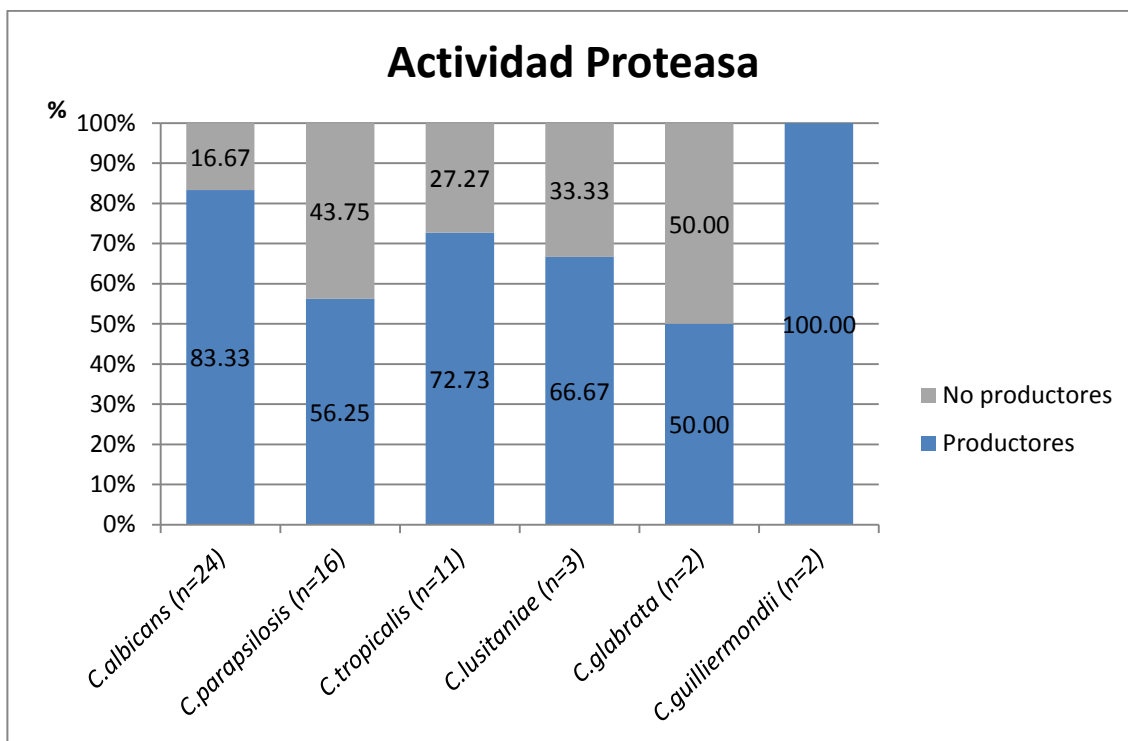


Figura 3: Relación entre las especies incluidas en el estudio y la actividad proteasa.

La figura 4 exhibe la relación entre las especies incluidas en el estudio y la actividad fosfolipasa. Cinco (20,83%) aislados de *C. albicans* se incluyeron en la categoría de productores, seguidos de dos *C. parapsilosis* (12,50%) y cuatro *C. tropicalis* (36,36%), seguida de las especies *C. glabrata* y *C. guilliermondii*. Los tres aislados de *C. lusitaniae* no mostraron dicha actividad.

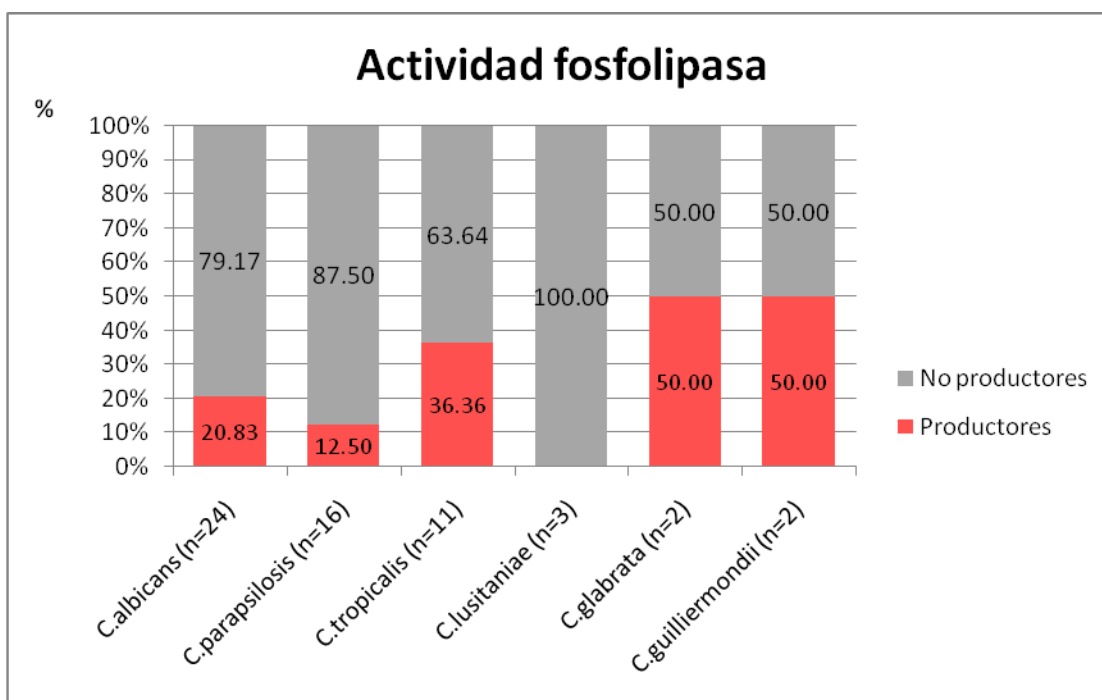


Figura 4: Relación entre las especies incluidas en el estudio y la actividad fosfolipasa.

3.2. Pruebas de Susceptibilidad

En la figura 5 se observa el comportamiento de los aislados de *Candida* frente a la anfotericina B. Los resultados de los aislados exhiben la respuesta esperada en cuanto a las CMI, denotando una elevada susceptibilidad a este antifúngico. Solo cuatro aislados, una *C. albicans* y tres *C. tropicalis*, para un 6,90%, presentaron resistencia a este antifúngico. El resto de los aislados fueron susceptibles a este antifúngico.

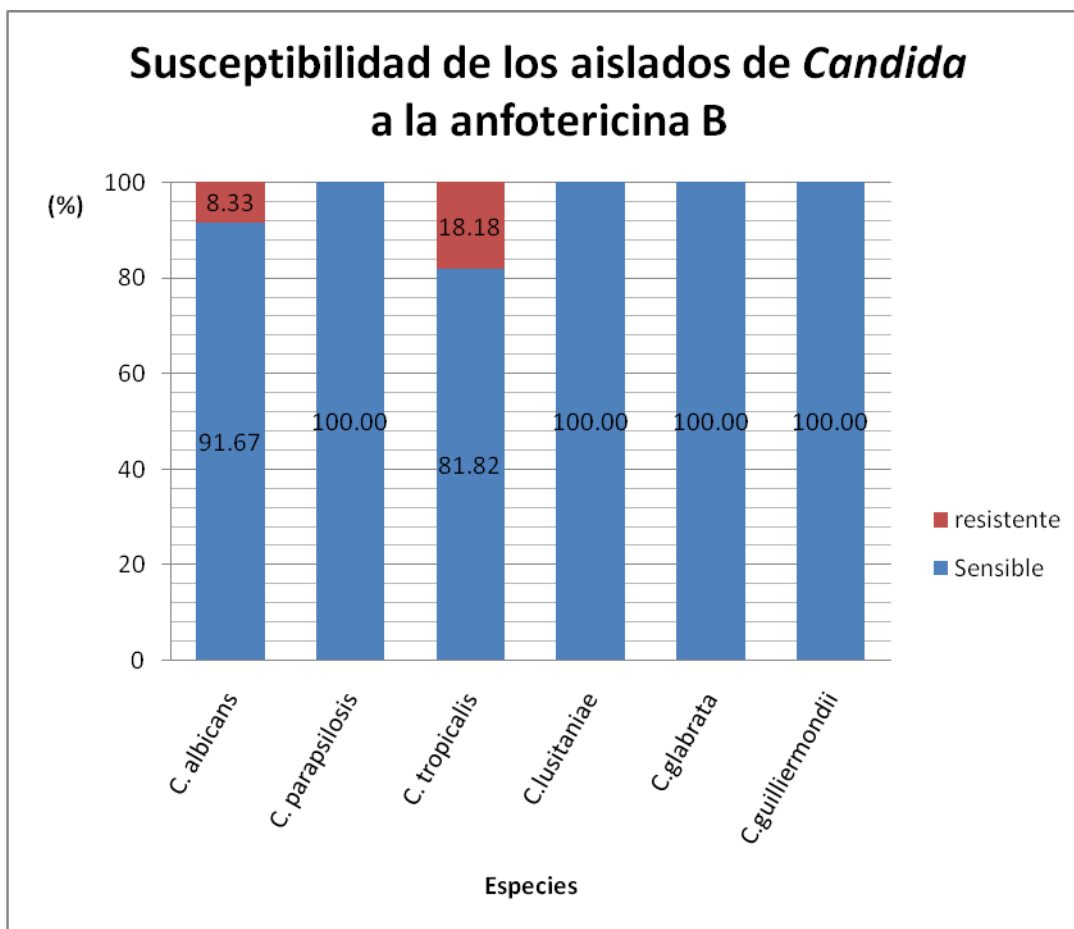


Figura 5: Perfiles de susceptibilidad frente a anfotericina B de los aislados estudiados distribuidos por especie

La susceptibilidad *in vitro* frente a IT en cada una de las especies estudiadas se muestra en la figura 6. Se encontraron 20 aislados de *C. albicans* susceptibles a este antifúngico correspondiente a 83,33 %. Cuatros aislados fueron resistente con una CMI $\geq$ a 6 $\mu\text{g/mL}$. El 100 % de los aislados de *C. glabrata* y *C. guilliermondii* fueron sensibles a este antifúngico. El resto de las especies mostraron un perfil de susceptibilidad variable para IT.

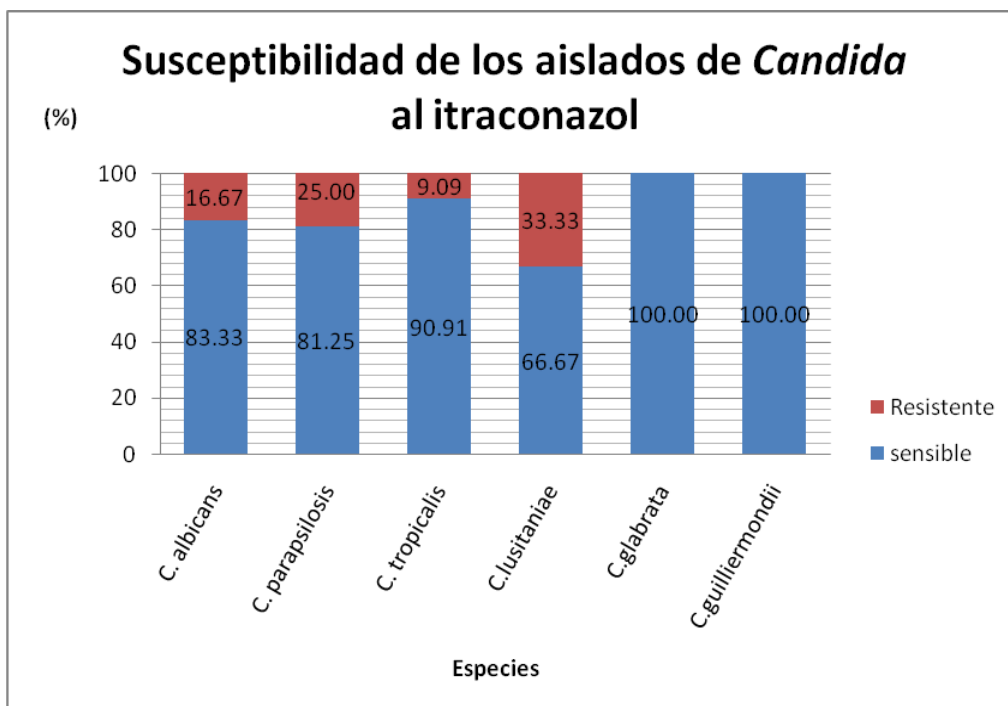


Figura 6: Perfiles de susceptibilidad frente a itraconazol de los aislamientos estudiados distribuidos por especies.

Como se ilustra en la figura 7, los aislados en su mayoría (44/58) fueron susceptibles frente a FL. Se constató resistencia en todas las especies excepto los dos aislados de *C. guilliermondii*, que fueron sensibles a este antifúngico.

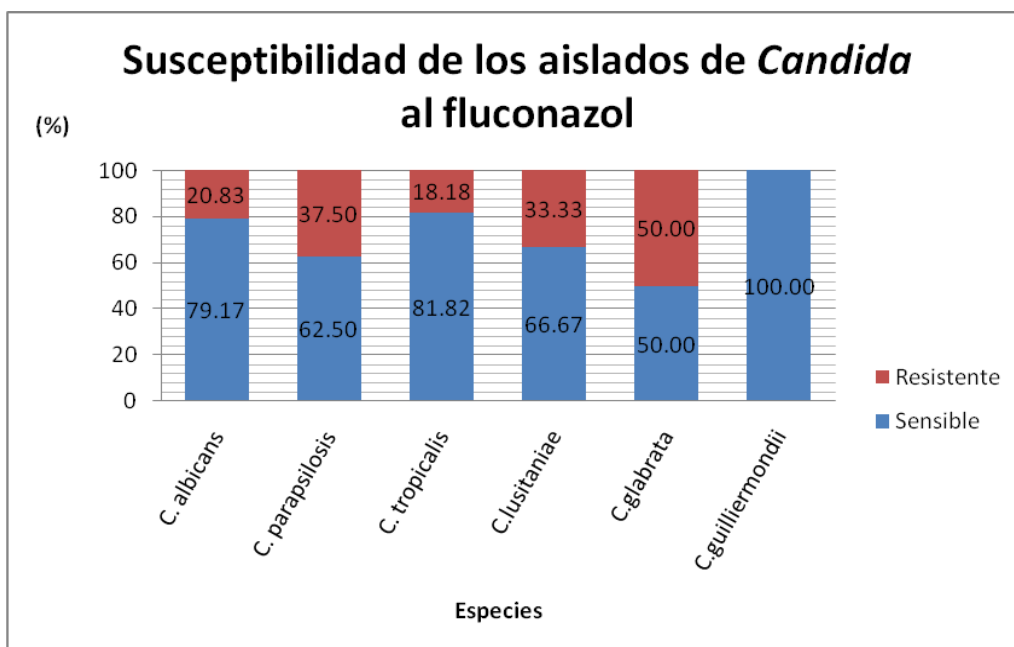


Figura 7: Perfiles de susceptibilidad frente a fluconazol de los aislados estudiados distribuidos por especies.

La relación entre el total de especies analizadas y sus respectivas CMI, así como la CMI50 y CMI 90 se muestra en la Tabla 3. De manera general la anfotericina B tuvo un amplio rango de CMI (0,25 µg/mL – 6 µg/mL); una concentración de 0.25 µg/mL fue necesaria para inhibir el crecimiento del 50% de los aislados y de 1 µg/mL para el 90% de los mismos. Las especies con mayores valores de CMI de anfotericina B fueron *C. albicans*, con un aislado con CMI = 4 µg/mL y *C. tropicalis*, la cual exhibió tres aislados con CMI = 6 µg/mL.

Tabla 3. Valores de los rangos de concentraciones, CMI₅₀ y CMI₉₀ de anfotericina B, fluconazol e itraconazol frente a los aislados estudiados, agrupados por especies.

Especies	Antifúngico*	CMI (µg/mL)		
		Rango de concentraciones	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>C. albicans</i> n=24	AP	0,25 - 6	0,25	1
	FL	0,25 - 6	0,5	4
	IT	0,12 - 6	0,12	6
<i>C. parapsilosis</i> n=16	AP	0,25 - 1	0,25	0,5
	FL	0,25 - 6	0,5	6
	IT	0,12 - 6	0,12	6
<i>C. tropicalis</i> n=11	AP	0,25 - 6	0,5	4
	FL	0,25 - 4	0,5	1
	IT	0,12 - 4	0,12	0,12
<i>C. lusitaniae</i> n=3	AP	0,5 - 1	0,5	0,5
	FL	0,25 - 0,5	0,25	0,5
	IT	0,12 - 6	0,12	0,25
<i>C. glabrata</i> n=2	AP	1	1	1
	FL	1 - 64	1	64
	IT	0,12	0,12	0,12
<i>C. guilliermondii</i> n=2	AP	0,25	0,25	0,25
	FL	0,25	0,25	0,5
	IT	0,12	0,12	0,12

AP: Anfotericina B; FL: Fluconazol; IT: Itraconazol.

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

En pleno siglo XXI las micosis invasoras se siguen asociando con una elevada morbimortalidad y son la causa de un notable impacto asistencial y económico en los sistemas de salud de todo el mundo. Además, en los últimos años se ha observado un cambio etioepidemiológico en las micosis con un preocupante aumento de los patógenos fúngicos resistentes o con sensibilidad disminuida a algunos fármacos de elección para su tratamiento. Hay que añadir dos importantes condicionantes que dificultan el manejo apropiado de las micosis invasoras. Por una parte, el considerable incremento del número de pacientes inmunodeprimidos atendidos en todos los hospitales y el escaso arsenal terapéutico disponible para tratar adecuadamente estas micosis invasoras, ya que solo se dispone de tres familias de fármacos antifúngicos: polienos, azoles y equinocandinas (Pemán y Quindós , 2021).

La actividad enzimática del género *Candida* constituye un factor crucial en la patogenia de esta infección y de conjunto con los estudios de susceptibilidad a los antifúngicos, son temas de investigación de gran actualidad (Kalaiarasan *et al.*, 2018). La mayoría de los reportes sobre el tema se focalizan principalmente en *C. albicans*. Con el incremento que existe en el presente de otras especies diferentes de *C. albicans*, es necesario desarrollar investigaciones que permitan caracterizar de manera adecuada su actividad enzimática (Cortés *et al.* 2019).

En Cuba, recientemente se comenzó a incursionar en esta temática y se pretende, siempre que sea posible, acompañar los estudios de vigilancia de la susceptibilidad a los antifúngicos con los de la expresión de diferentes factores de virulencia. Esto permitirá evaluar el comportamiento de los aislados de *Candida* de diferentes sitios anatómicos y detectar a tiempo cambios en su resistencia o capacidad patogénica que faciliten realizar la necesaria alerta epidemiológica.

En este estudio se observa una prevalencia de *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae*. En cambio en Costa Rica, México y Venezuela, *C. parapsilosis* es la más prevalente seguida por *C. albicans* (Aguilar., *et al* 2020).

Se considera que la producción de proteasas y fosfolipasas juega un papel importante en la patogenicidad de los hongos oportunistas. Existe un gran número de publicaciones en las cuales se examina la producción de estas enzimas hidrolíticas en aislados de *C. albicans* y su papel en la patogénesis de la candidiasis invasora, ya que están relacionadas con su virulencia (Kalaierasan et al., 2018; Ahmed et al., 2019; Erum et al., 2020).

La mayoría de las investigaciones acerca del tema se centran en *C. albicans*, ya que es considerada la especie más patogénica y más frecuente dentro del género, mientras que en las restantes especies estos factores no han sido estudiados en detalle (Galán-Ladero et al., 2010). Sin embargo, el aumento paulatino en la frecuencia de estas últimas como agentes etiológicos de candidiasis invasora, y su tendencia a adquirir resistencia a múltiples fármacos debería ser un llamado de atención a desarrollar más investigaciones que permitan caracterizar de manera adecuada la actividad enzimática de otras especies de *Candida* de importancia clínica (Ahmed et al., 2019).

Las fosfolipasas secretadas por *Candida* tienen una estrecha relación con su virulencia, se les considera necesarias en los procesos de invasión y colonización de los tejidos debido al papel que juegan en la destrucción de las membranas de las células del hospedero (Mayer et al., 2013). Las proteasas, en especial el grupo de las proteasas aspárticas secretadas (Saps), son también un factor clave en la virulencia de estos microorganismos. Junto con las fosfolipasas son responsables de mediar el proceso de invasión a los tejidos, además de jugar un papel importante en evadir al sistema inmunológico del hospedero a través de la degradación de proteínas del complemento e inmunoglobulinas (Silva et al., 2011). También se ha asociado a las Saps con el proceso de adherencia de *Candida* (Modrzewska y Kurnatowski, 2015).

La función de estos dos grupos de enzimas en la patogenicidad está estrechamente relacionada, y la ausencia o disminución en la expresión de las mismas puede ser indicativo de una reducción de la virulencia en algunas especies (Souza et al., 2015).

En este estudio la actividad de ambas enzimas fue examinada simultáneamente en las mismas cepas de levaduras, utilizando medios de cultivo sólido, siendo además medidas y calculadas. Para ambas enzimas un halo de precipitación alrededor del área de crecimiento fue evidencia de una actividad enzimática positiva. Los resultados de fosfolipasa se expresaron mediante el índice Pz que indica la relación entre el diámetro de la colonia y el diámetro en mm de la colonia más el halo de precipitación y la actividad proteasa se expresó como el diámetro en mm del halo de precipitación.

El número de aislados con actividad enzimática en el presente trabajo fue 13(22,41%) con actividad fosfolipasa y 42(72,41%) con actividad proteasa. Podemos apreciar diferencias en cuanto la expresión de estas enzimas.

Entre los trabajos consultados, se puede mencionar un estudio previo realizado en el LM-IPK en 2019, donde se determina la actividad fosfolipasa y proteasa en 60 aislados procedentes de exudados vaginales y demuestran la expresión de estas enzimas en un 55% y 56% respectivamente (Caballero, 2019). A diferencia de estos porcentajes elevados de positividad Kalaiarasan *et al.* (2018) en Turquía, al estudiar 51 aislados de *Candida* de 50 pacientes con candidiasis vulvovaginal, corroboran la actividad de proteasas y fosfolipasas en el 37,3 %, y el 29,4 % respectivamente. Hacioglu *et al.* (2019) en la India confirman la producción de estas enzimas en 100 aislados vaginales de *Candida*; la actividad fosfolipasa se evidenció en un 75 % de los aislados y la actividad proteasa en un 70 %.

Entre los reportes con resultados comparables a estos se puede mencionar el realizado por Kantarcioglu y Yucel en 2002 en Turquía, donde se analizó la actividad fosfolipasa y proteasa en 95 aislados de varias especies de *Candida* procedentes de diferentes sitios anatómicos, con un 62,1% de actividad fosfolipasa y 78,9% de proteasa. Deepa *et al.* (2015) determinaron la producción de estas enzimas por un grupo de 38 aislados orales de *Candida* en la India; la actividad fosfolipasa se evidenció en el 52,6% de los aislados y la actividad proteasa en el 86,8%. Similares resultados fueron obtenidos por Kumar *et al.* (2006) también en la India, en un estudio en el cual se incluyeron 61 aislados de *Candida* procedentes de diferentes sitios anatómicos (sangre, tracto

respiratorio, cavidad oral) de pacientes inmunocomprometidos; el 68,85% de los mismos fue productor de fosfolipasas mientras que la actividad proteasa fue detectada en un 83,6% de los aislados

Riceto *et al.* 2015 realizaron un estudio en Brasil donde se analizaron 50 aislados de *Candida* provenientes de sangre, líquido peritoneal y sinovial, sus resultados mostraron que solo 16 aislados (32%) produjeron fosfolipasas y 19 (38%) presentaron actividad proteasa. Otra investigación en este mismo país por Sav *et al.*, 2018, donde se estudiaron 50 aislados de *Candida* proveniente de pacientes con onicomicosis exhibieron baja actividad proteasa y fosfolipasa, se detectó 18% (9/50), 20% (10/50), respectivamente. La variabilidad en los porcentos de expresión de estas enzimas en los estudios anteriores pudiera ser explicada en parte por las diferencias que pueden existir entre los aislados autóctonos de una región con respecto a otra. También pudiese ser indicativo de que existe una relación entre las especies de *Candida* aisladas, el sitio de aislamiento y la expresión de estos factores de virulencia.

Nawaz *et al.*, en 2018 reporta en la cavidad oral de pacientes con cáncer que la “*C. no albicans*” tiene más actividad proteasa que *C. albicans*. Ahmed *et al.*, (2019) realiza un estudio en el hospital universitario de Mansoura, Egipto donde incluyeron 164 aislados de *Candida* procedentes de orina, esputos, cavidad oral, garganta y escaras en pacientes hospitalizados, la especie más prevalente fue *C. tropicalis* seguida *C. albicans*. Todos los aislados de *C. albicans* produjeron fosfolipasa (51/51), solo 1/97 de *C. tropicalis* exhibió dicha actividad. Las otras especies no mostraron actividad a esta enzima.

Las tasas de producción de fosfolipasas y proteasas son mucho mayores en *C. albicans*, mientras que en las especies “no *albicans*” la actividad enzimática es menor. Erum *et al.*, (2020) evaluaron la actividad proteasa y fosfolipasa de 128 aislados de *Candida* procedentes de heridas quirúrgicas en Pakistan; el 90.74% de los aislados de *C. albicans* tuvo actividad proteasa y el 85.18% fosfolipasa, mientras que de las restantes especies el 70.27% fue productor de proteasas y el 27.02% de fosfolipasas

En el estudio de Riceto *et al*, (2015) el total de aislados de *C. albicans* produjo fuerte actividad fosfolipasa, encontrándose diferencias significativas entre *C. albicans* con respecto a las otras especies analizadas (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. glabrata*) ($p < 0,05$). En la India Lahkar *et al*, 2017 obtuvieron 53 aislados de *Candida* en la orofaringe de pacientes con VIH; la especie con mayor prevalencia fue *C. albicans*, la cual mostró actividad fosfolipasa (90.24%) y proteasa (86%).

Se encontraron pocos trabajos que caracterizaron la actividad enzimática en aislados procedentes de hemocultivos; en muchos de los estudios que se mencionan a continuación donde se analizan aislados de diversos sitios anatómicos se incluyen algunos de sangre, pero el tamaño de la muestra es muy pequeño y resulta difícil establecer comparaciones.

La variabilidad en los porcentajes de producción de proteasas en este estudio, así como en los antes expuestos, pudiera ser expresión de la diferencia en el número de aislados de *C. albicans* que se identificaron en cada uno de ellos. Es conocido que esta especie posee gran capacidad de producción para ambas enzimas a diferencia de las "*C. no albicans*" (Kalaïarasan *et al.*, 2018).

La presencia en este estudio de 20 *C. albicans* entre los 24 aislados en los que se determinó la capacidad de producir estas enzimas es un ejemplo de lo afirmado anteriormente. En todos los estudios consultados se evidencia la mayor actividad proteasa, resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo.

Referente a la producción de proteasas por *C. tropicalis* y *C. albicans* (fig.3) en la investigación desarrollada se encontraron valores superiores a los que reportan Kalaïarasan *et al*, (2018) quienes obtienen el 41, 67 % y el 44, 44 % para estas especies respectivamente.

En todas las especies se constató la producción de enzimas proteasas. El resultado de proteasas obtenido de *C. parapsilosis* (56,25 %) en el presente estudio no coincide con el previo reporte de Caballero (2019) quien detecta un 77,78 % de aislados

productores de proteasas. De manera similar, Shirkhani *et al.*, (2016) en Irán, informan un 100% de aislados de micosis vulvovaginal que exhiben producción de esta enzima. Son varios los estudios que refieren una producción elevada de proteasas por *C. parapsilosis* (Shirkhani *et al.*, 2016).

En *C. parapsilosis* se identifican tres genes (*APSP1-3*) que codifican para enzimas proteasas. La expresión de estos genes varía entre los diferentes aislados clínicos cuando estos crecen en contacto con el epitelio oral e incluso entre los obtenidos de vida libre. Existe la tendencia a relacionar la producción de proteasas y el sitio anatómico de donde se obtuvo el aislado por el hecho de que los que se obtienen de piel y vagina exhiben *in vitro* mayor actividad proteasa que los que se obtienen de hemocultivos (Silva *et al.*, 2011).

Existen varios estudios que documentan la producción alta de proteasas por *C. tropicalis*. Esta especie posee al menos cuatro genes que codifican para las proteasas extracelulares (SP1 - SP4) las cuales se encuentran presentes en la superficie de la levadura cuando penetran los tejidos en el transcurso la infección diseminada o cuando evaden los macrófagos durante la fagocitosis. La expresión de estas enzimas en el proceso de colonización del epitelio oral no está asociada a invasión ni a daño de los tejidos (Shirkhani *et al.*, 2016).

La contribución de las proteasas extracelulares en la patogenia de las infecciones por *C. albicans* es controversial; investigaciones recientes indican que estas no son necesarias para la invasión *in vitro* al epitelio humano. Sin embargo, la gran cantidad de genes que codifican para las mismas en *C. albicans* en comparación con otras especies menos invasoras sugiere que existe un papel dentro de la patogenia para este grupo de enzimas (Mayer *et al.*, 2013).

La frecuencia mundial de infecciones superficiales y profundas por *C. glabrata* es elevada, se identifica en la actualidad como un patógeno oportunista emergente. Esta especie se relaciona como segunda causa de candidiasis invasora en gran parte del orbe. Al no producir filamentos pudiera llevar a pensar que es menos virulenta, pero en

cambio, sí produce proteasas y presenta hidrofobicidad en su superficie celular, similar a *C. albicans* lo que facilita su adherencia (Muñoz, 2015).

En cuanto a la superioridad observada en la actividad fosfolipasa en el trabajo de Caballero, podrían estar influyendo varios factores. Deberían tenerse en cuenta las diferencias en el origen de los aislados (vaginales y de hemocultivos); además que la distribución de especies es muy diferente: en el primero un gran porcentaje (83,6%) son aislados de *C. albicans*, lo que pudiera estar determinando el alto índice de actividad fosfolipasa que se observa en sus resultados. No se pudo establecer una comparación en cuanto a la producción enzimática por especies debido a que la frecuencia de aislados de cada una difiere bastante entre ambos estudios.

En la mayoría de los reportes consultados, la producción de fosfolipasas en *C. albicans* es superior a la de otras especies, independientemente del sitio de aislamiento (Atalay *et al.*, 2015). Esto denota que la capacidad de expresión de estas enzimas por ella está sujeta a pocas variaciones, las diferencias obtenidas pudieran relacionarse más con cambios en la fisiología de un aislado con respecto a otro, que con otros factores. De las cuatro fosfolipasas que secreta *C. albicans*, fosfolipasa B es la más importante. La virulencia de esta especie es atenuada de forma experimental con la eliminación del gen *caPLB1* y restaurada con la reintroducción de este confirmándose así que la misma juega un papel clave en la infección. Algunos autores encuentran una correlación elevada entre la producción de esta enzima y el incremento de la resistencia a los azoles (Erum *et al.*, 2020).

Sería especulativo arribar a conclusiones en lo que respecta a la producción de fosfolipasas por *C. tropicalis* (36,36 % de productores) y *C. glabrata* (50 % de productores) porque fueron pocos los aislados procesados de estas especies (once y dos respectivamente). No obstante, en un trabajo previo que se realiza en el mismo laboratorio (LM-IPK), con diferencias en cuanto a tipo de muestras, pero similitud al número y especies incluidas, así como la metodología; se obtienen valores cercanos (33.33% en *C. tropicalis* y 66.67 % en *C. glabrata*) (Caballero, 2019). Teniendo en

cuenta lo expuesto, se asumió que estas especies cuando proceden de muestras vaginales tienen capacidad para producir esta enzima.

El pequeño número de aislados pertenecientes a otras especies como *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae* dificultan su comparación con otros estudios. No obstante, los resultados obtenidos con respecto a la actividad fosfolipasa y proteasa de estos aislados son similares a los reportes de Deepa *et al*, (2015).

Los factores de virulencia de *Candida* constituyen un aspecto de suma importancia en la infección de estos microorganismos, desde la producción de enzimas líticas hasta la capacidad de formar biopelículas. Es por eso que una adecuada caracterización de los mismos contribuiría a la mejor comprensión de la patogenia de la candidiasis, con todas las implicaciones que tendría para el correcto manejo de las infecciones causadas por estos microorganismos.

En la actualidad existe una gran variedad de métodos para cuantificar los factores de virulencia, por lo que en ocasiones es complicado establecer comparaciones cuando se tienen tantas fuentes de variación extrínsecas que pudiesen estar influyendo sobre los resultados. Es entonces necesario que se logren estandarizar los métodos de uso más generalizado, en pos de poder caracterizar de manera satisfactoria la capacidad patogénica de *Candida* teniendo en cuenta aspectos de importancia epidemiológica y biológica como son: la región geográfica, el sitio de aislamiento y las diferencias fisiológicas entre especies e incluso, entre aislados (Ahmed *et al.*, 2019).

Debido a la naturaleza eucariota común de las células humanas y fúngicas, resulta difícil identificar componentes metabólicos o estructurales específicos de estas últimas que constituyan dianas para el desarrollo de agentes antimicrobianos. El papel fisiológico y diferente composición de los esteroides (colesterol en humanos y ergosterol en hongos) hacen que la membrana citoplasmática fúngica sea un blanco adecuado para la acción de fármacos antifúngicos (azoles y polienos) (Morace *et al.*, 2014).

La anfotericina B es un polieno que se une de manera irreversible al ergosterol de la membrana celular fúngica, resultando en alteraciones en la permeabilidad de la misma con efectos fungicidas. En sus nuevas formulaciones, continúa siendo el fármaco de elección para el tratamiento de micosis severas en pacientes inmunocomprometidos o con graves patologías subyacentes (Pemán y Quindós., 2021).

En el presente estudio se detectaron cuatro aislados con una CMI por encima de 1 µg/mL para éste antifúngico; uno de *C. albicans* (4,16%), tres de *C. tropicalis* (18.75%). Este porcentaje, teniendo en cuenta el tamaño de la muestra (n=58), está por encima de lo reportado por otros investigadores para este fármaco (Eksi *et al.*, 2013; Mulu *et al.*, 2013; dos Santos *et al.*, 2014; Aydemir *et al.*, 2017) donde los porcentajes de resistencia varían desde 0 hasta 4 % aproximadamente. Este dato resulta de gran relevancia en Cuba, dado que la anfotericina B es el fármaco de elección para el tratamiento de la candidiasis invasora y no se encontraron reportes previos de tales porcentajes de resistencia.

Ante la repercusión que tendrían estos resultados en el manejo de la candidiasis invasora en el país, se decidió investigar el origen de los aislados en los libros de registro del Laboratorio de Micología del Instituto Pedro Kourí (IPK). Mediante esta búsqueda se pudo constatar que los aislados de *C. tropicalis* que mostraron patrones de resistencia a la anfotericina B pertenecían a tres hemocultivos de un mismo paciente realizados en distintos momentos de su evolución clínica, como parte del esquema de seguimiento y diagnóstico de candidiasis invasora establecido en esta institución. El patrón de resistencia común mostrado por los tres aislados de este paciente, sugieren que un mismo aislado de *C. tropicalis* fue el que mostró resistencia a la anfotericina B.

La resistencia a la anfotericina B es un fenómeno poco común, debido a que su inherente efecto fungicida limita la selección de mutantes (Maubon *et al.*, 2014). Los mecanismos implicados no son del todo conocidos, se sugiere que la falta total de ergosterol en la membrana, afectaciones en la estructura de este componente que impidan la unión de la anfotericina B o alteraciones en la ruta biosintética que lleven al reemplazo del ergosterol por otros esteroides con menor afinidad hacia los polienos

podrían ser la causa de la resistencia (Morace *et al.*, 2014). Estas alteraciones se han asociado con mutaciones en los genes *erg 2* o *erg3*, que codifican enzimas que participan en la vía de síntesis del ergosterol (Cuenca, 2010).

Dentro de los reportes de aislados con resistencia a anfotericina B que se consultaron, *C. tropicalis* y *C. albicans* fueron especies relativamente frecuentes. Un estudio llevado a cabo en Brasil por de Almeida *et al.* en 2014 donde se evaluó la susceptibilidad antifúngica de 15 aislados de *C. tropicalis* de pacientes con candiduria frente a fluconazol y anfotericina B, reveló una CMI 50 y CMI90 de 1 µg/mL para el total de aislados y que uno fue resistente a la anfotericina B (CMI 16 µg/mL). Mulu *et al.* (2013) en Etiopía analizaron la susceptibilidad de 90 aislados de *Candida* procedentes de enjuagues bucales de pacientes con infección por el VIH, y encontraron 3 aislados de *C. albicans* resistentes a la anfotericina B (3,5%). Por otra parte Aydemir *et al.*, en 2017 reportaron que de 169 aislados de *Candida* evaluados, 7 fueron resistentes a la anfotericina B (dos de *C. albicans* y dos de *C. tropicalis*). Sütçü y colaboradores en Turquía 2017 investigaron la candidiasis invasora en niños y sus perfiles de susceptibilidad frente a la anfotericina B, fluconazol e itraconazol entre otras drogas antifúngicas, la resistencia a la anfotericina B fue de 3.7%.

El estudio de Erum y colaboradores en Pakistan 2020, registró 100% de sensibilidad a anfotericina B, 98% itraconazol y 89% fluconazol de los aislados de *Candida* spp.

Los antifúngicos pertenecientes al grupo de los azoles son inhibidores de la citocromo P450 14 α demetilasa, una enzima que resulta esencial para la síntesis de ergosterol por las células fúngicas. Los triazoles, dentro de los que se incluyen el itraconazol y fluconazol, son ampliamente utilizados en el tratamiento de la candidiasis invasora y otras micosis sistémicas debido a que su nivel de toxicidad es mucho menor en comparación con los imidazoles que, a excepción del ketoconazol, solo pueden emplearse de manera tópica (Nett y Andes, 2015).

De los aislados analizados en el presente estudio 48/58 y 44/58 resultaron ser susceptibles a itraconazol y fluconazol respectivamente. En cuanto a la resistencia

10/58 y 14/58 aislados fueron resistentes a itraconazol y fluconazol respectivamente. Se encontraron patrones resistentes: cinco de *C. albicans*, seis de *C. parapsilosis* y dos de *C. tropicalis* al fluconazol. Dos Santos *et al* 2014 reportaron valores similares de resistencia cuando encontraron 12 aislados resistentes al fluconazol en un estudio retrospectivo donde evaluaron la susceptibilidad de 111 aislados de *Candida* procedentes de casos de candidemia, de los cuales tres fueron de *C. albicans*, dos de *C. glabrata*, uno de *C. tropicalis* y seis de *C. krusei*. En Cuba un estudio de Garcia, 2017 el 90% (54 aislados procedentes de candidemia) resultó ser susceptible a este fármaco, un aislado fue susceptible dependiente de la dosis y en el 8,33% (5 aislados) se encontraron patrones resistentes: dos de *C. albicans*, dos de *C. krusei* y uno de *C. glabrata*

En la actualidad, han sido reportados tres mecanismos de resistencia a los azoles entre las especies de *Candida*: la sobreexpresión de bombas de eflujo; mutaciones en el gen *erg11* que conllevan a la sobreexpresión de la enzima citocromo P450 14 α esterol demetilasa o a una disminución progresiva de la afinidad de esta por la molécula de antifúngico; y por último mutaciones en el gen *erg3* que provocan la síntesis de otros esteroides como componentes de la membrana celular, de forma que su integridad no se ve afectada por la acción de los azoles (Peyton *et al.*, 2015). Más de un mecanismo puede actuar de forma simultánea en un aislado en particular, por lo que su patrón de resistencia podría deberse a un efecto aditivo o conllevar al desarrollo de resistencia cruzada con otros antifúngicos (Sanguinetti *et al.*, 2015).

A pesar de que la resistencia de *C. albicans* al fluconazol no suele ser común (Maubon *et al.*, 2014), estudios como el China-SCAN han reportado altas tasas de resistencia en esta especie (9,4%), lo que pudiera ser indicativo de que existen diferencias entre las regiones geográficas en cuanto a los patrones de susceptibilidad (Liu *et al.*, 2014). En Cuba, el estudio de Fernández *et al.* (2007) reveló que dos aislados de *C. albicans* fueron resistentes al fluconazol y tres fueron sensibles dependientes de la dosis, resultados que son comparables a los obtenidos en el presente trabajo (cuatro aislados resistentes), aunque debe considerarse que el número de aislados de *C. albicans* en el estudio de Fernández *et al* fue mucho mayor (176 aislados).

La emergencia de las especies “no albicans” como agentes etiológicos de la candidiasis invasora es un aspecto de gran importancia epidemiológica debido a las variaciones en la susceptibilidad y el aumento de su resistencia a los agentes antifúngicos (Aydemir *et al.*, 2017).

La amplia utilización del fluconazol como terapia empírica de la candidiasis invasora e incluso en tratamientos profilácticos de pacientes hospitalizados con riesgo de contraer esta enfermedad, ha traído aparejada la aparición de aislados con resistencia adquirida (Allen *et al.*, 2015). Este fenómeno ha sido particularmente estudiado en aislados secuenciales de *C. albicans* procedentes de casos de candidiasis mucocutánea en pacientes infectados por el VIH que han sido sometidos a largos tratamientos con fluconazol (Ngouana *et al.*, 2019) y aunque se considera menos frecuente que la resistencia intrínseca, existen reportes de aislados con resistencia adquirida a fluconazol e incluso a más de un antifúngico (Asner *et al.*, 2015; Jensen *et al.*, 2015).

La aparición de aislados multirresistentes es un evento bastante raro en la práctica clínica, y se asocia más con resistencia adquirida que con resistencia intrínseca. Se logra detectar a través de la obtención de aislados seriados de un mismo paciente usualmente sometido a extensos ciclos de tratamiento antifúngico y con graves patologías subyacentes (Jensen *et al.*, 2015).

De forma similar, Jensen *et al.* (2015) evaluaron la susceptibilidad de 9 aislados de *C. albicans* obtenidos en diferentes momentos (2006-2011) a partir de un paciente hospitalizado con graves complicaciones, que había presentado repetidos episodios de candidiasis orofaríngea y esofágica por lo que se había sometido a varios ciclos de tratamiento antifúngico. Siete de los aislados mostraron algún grado de resistencia, de los cuales dos fueron multirresistentes a varios fármacos, incluyendo anfotericina B y fluconazol, pero también voriconazol, posaconazol y caspofungina. En ambos estudios, se realizaron análisis del contenido de lípidos de la membrana celular de los aislados, cuyos resultados revelaron la sustitución del ergosterol por otros esteroides, lo que

podría ser la causa de los patrones de resistencia frente al fluconazol y la anfotericina B.

En Cuba, el único reporte de este tipo que pudo ser consultado fue el de García en 2017 donde un aislado de *C. albicans* mostró un patrón multirresistente frente a los dos antifúngicos que fueron probados, con una CMI = 64 µg/mL para el fluconazol y de 4 µg/mL para la anfotericina B. Nolte *et al.* en 1997 reportaron dos casos de pacientes con leucemia que desarrollaron candidemia por aislados de *C. albicans* que desarrollaron resistencia al fluconazol y la anfotericina B, luego de haber sido sometidos a tratamientos profilácticos con fluconazol y terapia empírica con anfotericina B.

Toda esta información permite conocer el estado actual en el país de las infecciones por levaduras del torrente sanguíneo y sus perfiles de susceptibilidad. Tal información será de utilidad al momento de colaborar con el diseño de nuevas estrategias para el diagnóstico y posibles tratamientos de la candidemia. Estas nuevas estrategias resultarán en beneficio directo, no solo sobre la mejor resolución de la salud de los enfermos, sino también, en el uso racional de los tratamientos antifúngicos.

El conocimiento tanto de la potencialidad patogénica como de los perfiles de susceptibilidad antifúngica de aislados autóctonos de *Candida* es de suma importancia para el manejo adecuado de las infecciones provocadas por este género en cada región geográfica, teniendo en cuenta las diferencias en la distribución de especies y otras particularidades. Todo esto aporta información en apoyo a la red de laboratorios clínicos en diagnóstico y vigilancia de la RAM, fundamental para optimizar la atención individual del paciente y fortalecer los programas de vigilancia. Por otra parte, la complejidad de la resistencia a los antimicrobianos en la actualidad y la evolución permanente de la misma requieren laboratorios de referencia muy fortalecidos en pruebas de diagnóstico y susceptibilidad que proporcionen alternativas terapéuticas en casos especiales. Además, permite la evaluación de la identidad entre patógenos para determinar su diseminación y caracterizar brotes de enfermedades infecciosas tanto a nivel hospitalario como comunitario.

CONCLUSIONES

- A pesar de que existieron diferencias en el grado de expresión de enzimas hidrolíticas, se comprobó que la mayoría de las especies del género *Candida* aisladas de candidemia producen dichas enzimas. No obstante, la no producción de estas enzimas sugiere que la patogenia de la CI es multifactorial.
- La alta sensibilidad a la anfotericina B ratifica su uso como tratamiento de elección en las IFI en nuestro país.
- La resistencia frente al fluconazol, constituye una alerta para establecer una estrecha vigilancia clínica epidemiológica, debido a que este es el medicamento de elección como profilaxis en pacientes hospitalizadas con riesgo de contraer candidiasis invasora.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de otros factores de virulencia como la adherencia, la actividad hemolítica, la producción de biopelículas, producción de esterasas y otras enzimas líticas.
- Ampliar el análisis de la susceptibilidad hacia otros antifúngicos que se utilizan en el tratamiento de la candidiasis invasora, como el voriconazol y las equinocandinas.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar G, Araujo P, Lird G, Insaurrealde S, Kawabata A, Ayala E *et al.* Identificación y perfil de sensibilidad de *Candida* spp. aisladas de hemocultivos en hospitales de Paraguay Rev Panam Salud Pública 2020; 44:34. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.34>.
2. Ahmed N, Rizk DE, El Said M, Barwa RMF, Elsokary MA, Hassan RHI. Molecular identification and virulence factors determination in *Candida* species Isolated from Egyptian Patients. American Journal of Microbiological Research. 2019; 7(4):108-117. doi: 10.12691/AJMR-7-4-2.
3. Alkhazraji S, Gebremariam T, Alqarihi A, Gu Y, Mamouei Z, Singh S *et al.* Fosmanogepix (APX001) is effective in the treatment of immunocompromised micinfected with invasive pulmonary scedosporiosis or disseminated fusariosis. Antimicrob Agents Chemother. 2020; 64: e01735–1819.
4. Allen, D., Wilson, D., Drew, R. y Perfect, J. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. Expert Rev. Anti Infect. Ther, 2015; 13(6): 787-798.
5. Almirante B, Gamacho J, Maseda E, Candel FJ, Grau S, Guinea J *et al.* Abordaje de la candidemia y la candidiasis invasora en el paciente crítico: papel de las equinocandinas. Rev Esp Quimioter 2017; 30(5): 355-367
6. Alvarado ML. Expresión de factores de virulencia de *Candida auris* como contribuyentes en la patogenicidad. Tesis para optar al título de: Master en Ciencias Básicas Biomédicas. Facultad de Ciencias, Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia. 2021.
7. Amezcua DG, García L., Mora HM. Análisis de la interacción *Candida* - Sistema inmune. Jóvenes de la Ciencia. 2018; 4(1): 784–788. Recuperado de <https://www.jovenesenlaciencia.uqto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/100>

[ew/2532](#).

8. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. J Infect Dis. 2017; 216: S445–451.
9. Asner S, Giulieri S, Diezi M, Marchetti O, Sanglard D. Acquired Multidrug Antifungal Resistance in *Candida lusitanae* during Therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59: 7715-7722.
10. Atalay MA, Koc AN, Demir G, Sav H. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood cultures. Niger J Clin Pract. 2015 Jan-Feb; 18(1): 52-5. doi: 10.4103/1119-3077.146979. PMID: 25511344.
11. Aydemir O, Demiray T, Köroğlu M, Aydemir Y ,Altındış M. Emerge of non-*albicans* *Candida* species; evaluation of *Candida* species and antifungal susceptibilities according to years. Biomed Res. 2017; 28 (4).
12. BioMérieux. Manual api® 20CAUX REF 20210
13. Bonifaz A. Candidiasis. En: Micología Médica Básica 5ta edición. Mc Graw Hill Interamericana Editores, S.A, México, 2015. p. 377-408.
14. Caballero B. Factores de virulencia y perfiles de susceptibilidad antifúngica en aislados de candidiasis vulvovaginal. Trabajo de Diploma. Facultad de Biología, UH. La Habana. 2019.
15. Cárdena LY, Perez JE. Mecanismos de resistencias a fluconazol expresado por *Candida glabrata*: una situación para considerar en la terapéutica. Investigación en Enfermería: Imagen y Desarrollo, 2020, vol. 22, ISSN: 0124-2059 / 2027-128X. En: <https://doi.org/10.11144/jJaveriana.le22.mrfe>
16. Carvajal SK, Lizarazo D, Duarte C, Escandon P. Identificación de aislamientos

de *Candida auris* recuperados a través de la vigilancia por laboratorio en Colombia: un reto para el diagnóstico. Rev Infectio. 2020; 24(4): 224-228.

17. Castro C, García E, Martín E. Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad in vitro a los antifúngicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019; 37(Supl 1): 32-39.
18. Cho EJ, Shin JH, Kim SH, Kim HK, Park JS, Sung H et al. Emergence of multiple resistance profiles involving azoles, echinocandins and amphotericin B in *Candida glabrata* isolates from a neutropenia patient with prolonged fungemia. Antimicro Chemother. 2015; 70: 1268-1270.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. 2nd ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
21. Colombo AL, De Almeida JN, Guinea J. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. Curr Opin Infect Dis. 2017; 30: 528-538.
22. Cortés JA, Corrales IF. Invasive candidiasis: Epidemiology and risk factors in fungal infection. Londres: Intech Open. 2019; 33-46.
23. Criseo G, Scordino F, Romeo O. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. J. Micro. Meth. 2015; 11: 56-57.
24. Cuenca E M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. Rev

Esp Quimioter. 2010; 23(4): 169-176.

25. Czechowicz P, Nowicka J, Gosciniak G. Virulence factors of *Candida* spp. and host immune response Important in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 5895.
<https://doi.org/10.3390/ijms23115895>
26. de Hoog GS, Guarro J, Tan CS, Winternmans RG, Gené. 2011. Pathogenic fungi and common opportunists. En: De Hoog GS, Guarro J, editores. Atlas of clinical fungi. Baarn and Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili.
27. Deepa K, Jeevitha T, Michael A. In vitro evaluation of virulence factor of *Candida* species isolated from oral cavity. J Microbiol Antimicrob. 2015; 7(3): 28-32.
28. Dos Santos E, Dal Forno C, Hernandez M, Kubiça T, Venturini T, Chassot F *et al.* Susceptibility of *Candida* spp. isolated from blood cultures as evaluated using the M27-A3 and new M27-S4 approved breakpoints. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2014; 56(6):477-482.
29. Eksi F, Dogan E, Balci I. In vitro susceptibility of *Candida* species to four antifungal agents assessed by the reference broth microdilution method. The Scientific World Journal 2013. doi: 10.1155/2013/236903.
30. Eraso MP, Ríos LA. Principales características de las biopelículas relacionadas con procesos patológicos descritos en humanos en los últimos 10 años, revisión sistemática. Rev Investigaciones Andina. 2016; 32(18): 1491-1506.
31. Erum R, Samad F, Khan A, Kazmi SU. A comparative study on production of extracellular hydrolytic enzymes of *Candida* species isolated from patients with surgical site infection and from healthy individuals and their co-relation with

- antifungal drug resistance. BMC Microbiol. 2020 Dec 3; 20(1): 368. doi: 10.1186/s12866-020-02045-6. PMID: 33272216; PMCID: PMC7713141.
32. Fernández CM, Martínez G, Illnait MT, Perurena MR, Aguila A, Brito, M. Sensibilidad *in vitro* de cepas de *Candida* frente a fluconazol y anfotericina B. Rev Cubana Med Trop. 2007; 59(2): 113-118.
 33. Fuentes E, Illnait M T. Diagnóstico micológico por técnicas no convencionales en el siglo XXI. Rev Cubana Med Trop. 2020;72(3):e532 versión impresa ISSN 0375-0760 versión On-line ISSN1561-3054.
 34. Galán MA, Blanco MT, Sacristán B, Fernández MC, Pérez C, Gómez AC. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. Med Mycol 2010; 48: 207–210.
 35. García A. Factores de virulencia y susceptibilidad antifúngica en aislados de *Candida* procedentes de casos de candidiasis invasora. Trabajo de Diploma. Facultad de Biología, UH. La Habana. 2017.
 36. García D, Abreu R, Mesa L, López M, Truffín CM. Situación actual de la candidiasis sistémica en pacientes hospitalizado. Acta Médica del Centro. 2020; 14(2): 182-181.
 37. García, J. Pemán Diagnóstico microbiológico de las micosis invasoras. Rev Iberoam Micol. 2018; 35(4):179–185.
 38. Hacıoglu M, Guzel CB, Savage PB, Tan ASB. Antifungal susceptibilities, in vitro production of virulence factors and activities of ceragenins against *Candida* spp. isolated from vulvovaginal candidiasis. Med Mycol. 2019 Apr 1; 57(3): 291-299. doi: 10.1093/mmy/myy023. PMID: 29846682.
 39. Jacobsen I D, Wilson D, Wächter B, Brunke S, Naglik J, Hube B. *Candida*

albicans dimorphism as a therapeutic target. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2012; 10(1): 85-93.

40. Jensen RH, Astvad KM, Silva LV, Sanglard D, Jørgensen R, Nielsen KF, Mathiasen EG, Doroudian G, Perlin DS, Arendrup MC. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. J Antimicrob Chemother. 2015 Sep;70(9):2551-2555. doi: 10.1093/jac/dkv140. Epub 2015 May 27. PMID: 26017038; PMCID: PMC4553713.
41. Kantarcioglu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses. 2002 Jun; 45(5-6): 160-165. doi: 10.1046/j.1439-0507.2002.00727.x. PMID: 12100532.
42. Kalaiarasan K, Singh R, Chaturvedula L. Changing virulence factors among vaginal non-*albicans Candida* species. Indian J Med Microbiol. 2018 Jul-Sep; 36(3): 364-368. doi: 10.4103/ijmm.IJMM_18_94. PMID: 30429388.
43. Kumar CP, Kumar SS, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. Mycopathologia. 2006 Apr; 161(4): 213-218. doi: 10.1007/s11046-005-0157-4. PMID: 16552483.
44. Lahkar V, Saikia L, Patgiri SJ, Nath R, Das PP. Estimation of biofilm, proteinase & phospholipase production of the *Candida* species isolated from the oropharyngeal samples in HIV-infected patients. Indian J Med Res. 2017 May; 145(5): 635-640. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1773_14. PMID: 28948954; PMCID: PMC5644298.
45. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. Horiz Med. 2018; 18(1): 75-85.

46. Liu X P, Fan SR, Peng YT, Zang HP Species distribution and susceptibility of *Candida* isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012 *Journal of Micologie Médicale* 2014; 456: 6.
47. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis*. 2017; 64: 134-140.
48. Lona JC, Gómez LM, Cordero A, Cortés S, Quiles M, Pérez RO *et al*. Incidencia y factores asociados a candidiasis invasora en una unidad de cuidados intensivos neonatales de México, *Anales de Pediatría*, 2021: <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2021.07.001>.
49. Maldonado I, Cataldi S, Garbasz C, Relloso S, Striebeck P, Guelfand L *et al*. Identificación de levaduras del género *Candida*: los métodos convencionales frente a MALDI-TOF MS. *Rev Iberoam Micol*. 2018; 35(3): 151-154.
50. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindós G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses* 2009; 54: 6-10.
51. Maubon D, Garnaud C, Calandra T, Sanglard D, Cornet, M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Med* 2014; 40: 1241-1255.
52. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; 4(2): 119-128.
53. McGinnis, M. R. *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. Academy Press INC. New York. 1980.

54. Mitchell AP. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 1998; 1: 687-692.
55. Modrzewska B, Kurnatowski P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. Ann Parasitol 2015; 61(1): 3-9.
56. Mohammadi F, Ghasemi Z, Familsatarian B *et al.* Relationship between antifungal susceptibility profile and virulence factors in *Candida albicans* isolated from nail specimens. Rev Soc Bras Med Trop. 2020; 53:e20190214. doi:10.1590/0037-8682-0214-2019
57. Morace G, Perdoni F, Borghi E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. Journal of Global Antimicrobial Resistance 2014; 2: 254-259.
58. Muango AT, Brevis PE, Mora CA. Portación de levaduras en manos de estudiantes de las carreras de Medicina y Enfermería de la Universidad de Talca. Boletín Micológico. 2017; 32(2): 8-14. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2017.32.2.994>
59. Mulu A., Kassu A, Anagaw B, Moges B, Gelaw A, Alemayehu M *et al.* Frequent detection of 'azole' resistant *Candida* species among late presenting AIDS patients in northwes Ethiopia. BMC Infect Dis 2013; 13: 82.
60. Muñoz GM. *Candida glabrata*: un patógeno emergente. Biociencias.2015; 10(1): 89-102.
61. Nawaz A, Mäkinen A, Pärnänen P, Meurman JH. Proteolytic activity of non-*albicans* *Candida* and *Candida albicans* in oral cancer patients. New Microbiol 2018; 41(4): 296-301.

62. Nett JR, Andes DR. Antifungal agents: Spectrum of activity, pharmacology, and clinical implications. *Infect Dis Clin N Am*. 2015. doi:10.1016/j.idc.2015.10.012.
63. Ngouana TK, Toghueo RMK, Kenfack IF, Lachaud L, Nana AK, Tadjou L *et al*. Epidemiology and antifungal susceptibility testing of non-*albicans* *Candida* species colonizing mucosae of HIV-infected patients in Yaoundé (Cameroon). *J Mycol Med*. 2019 Sep; 29(3): 233-238. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.06.003. Epub 2019 Jun 14. PMID: 31204235.
64. Nolte FS, Parkinson T, Falconer DJ, Dix S, Williams J, Gilmore C *et al*. Isolation and characterization of fluconazole and amphotericin B resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1997; 44(1): 196-199.
65. Nouraei H, Pakshir K, ZareShahrabadi Z, Zomorodian K. High detection of virulence factors by *Candida* species isolated from bloodstream of patients with candidemia. *Microb Pathog*. 2020 Dec; 149: 104574. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104574. Epub 2020 Oct 17. PMID: 33075515.
66. Orellana JM, Pacheco KE. Identificación y susceptibilidad de *Candida* spp. en el área ginecológica. *Revista de Investigación en Salud* 2021; 4(11): 335-344.
67. Pana ZD, Roilides E, Warris A, Groll Ah, Zaoutis T. Epidemiology of Invasive Fungal Disease in Children. *J Pediatr Infect Dis Soc*. 2017 Sep1; 6(1): 3-11.
68. Pemán J, Quindós G. Anfotericina B liposomal: treinta años de una herramienta muy eficaz para el tratamiento de las micosis invasoras. *Rev Iberoam Micol*. 2021; 38(2): 39–41.
69. Peyton LR, Gallagher S, Hashemzadeh M. Triazole antifungals: a review. *Drugs Today (Barc)*. 2015 Dec; 51(12): 705-718. doi: 10.1358/dot.2015.51.12.2421058. PMID: 26798851.

70. Ge YP, Lu GX, Shen YN, Liu WD. In vitro evaluation of phospholipase, proteinase, and esterase activities of *Candida parapsilosis* and *Candida metapsilosis*. Mycopathologia. 2011 Dec; 172(6): 429-38. doi: 10.1007/s11046-011-9440-8. Epub 2011 Jun 23. PMID: 21698404.
71. Quiles I, García J. Antifúngicos de uso sistémico. Rev. Iberoam. Micol. 2021; 38: 42–46.
72. Quindós G, Gil-Alonso S, Marcos-Arias C, Sevillano E, Mateo E, Jauregizar N *et al*. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2019; 24(2): 172-180.
73. Riceto ÉB, Menezes Rde P, Penatti MP, Pedroso Rdos S. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. Rev Iberoam Micol. 2015 Apr-Jun; 32(2): 79-82. doi: 10.1016/j.riam.2013.11.003. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24704439.
74. Sandison T, Ong V, Lee J, Thye D. Safety and pharmacokinetics of CD101IV a novel echinocandin, in healthy adults. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 6(1): 1627-1716.
75. Sanguinetti M., Posteraro B. New approaches for antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Infect. 2017; 23: 931-934.
76. Sanguinetti, M., Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. Mycoses. 2015; 58 (2): 2-13.
77. Sav H, Baris A, Turan D, Altinbas R, Sen S. The frequency, antifungal susceptibility and enzymatic profiles of *Candida* species in cases of onychomycosis infection. Microb Pathog. 2018 Mar; 116: 257-262. doi: 10.1016/j.micpath.2018.01.036. Epub 2018 Feb 20. PMID: 29378232.

78. Shirkhani S, Sepahvand A, Mirzaee M, Anbari K. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* spp. isolates from vulvovaginitis in Iran. J Mycol Med. 2016 Sep; 26(3): 255-260. doi: 10.1016/j.mycmed.2016.05.001. Epub 2016 Aug 17. PMID: 27544321.
79. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. Trends Microbiol. 2011 May;19(5):241-7. doi: 10.1016/j.tim.2011.02.003. Epub 2011 Mar 15. PMID: 21411325.
80. Siqueira RA, Doi AM, de Petrus Crossara PP, Koga PCM, Marques AG, Nunes FG, Pasternak J, Martino MDV. Evaluation of two commercial methods for the susceptibility testing of *Candida* species: Vitek 2® and Sensititre YeastOne®. Rev Iberoam Micol. 2018 Apr-Jun; 35(2): 83-87. doi: 10.1016/j.riam.2017.11.001. Epub 2018 Mar 23. PMID: 29580699.
81. Souza A, Hartz S, Bittencourt C, da Silva L, de Mattos F, Severo LC. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. Rev Soc Bras Med Trop 2013; 46(3): 340-344.
82. Souza L, Silva L, Braga A, Souza L , Ribeiro M, Bridon D. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis, Rev. Iberoam. Micol. 2015; 32(2): 122-125.
83. Sütçü M, Acar M, Genç GE, Kökçü İ, Aktürk H, Atay G, Törün SH, Salman N, Erturan Z, Somer A. Evaluation of *Candida* species and antifungal susceptibilities among children with invasive candidiasis. Turk Pediatri Ars. 2017 Sep 1; 52(3): 145-153. doi: 10.5152/TurkPediatriArs.2017.5291. PMID: 29062248; PMCID: PMC5644581.

84. Víchez J, Lozano FJ, Morcillo D. Prevalencia de candidemias en las unidades de cuidados intensivos. *European Journal of Health Research*. 2017; 3(2): 91–102. <https://doi.org/10.30552/ejhr.v3i2.59>
85. Vieille OP. Identificación de cepas del complejo *Candida albicans* aisladas de muestras clínicas en la región de Valparaíso, Chile. *Boletín Micológico*. 2022; 37(1). <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2022.37.1.3217>
86. Vigezzi C, Riera FO, Rodriguez E, Icely PA, Miró MS, Figueredo CM, Caeiro JP *et al*. Candidiasis invasora: un enfoque a la infección en el sistema nervioso central. *Rev. Argent. Microbiol*. 2021; 53(2): 11-20.

Anexo 1.

Tabla 4. Valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$) para las cepas de referencia a las 48h M60 (CLSI, 2020).

Cepas de Referencia	Antifúngicos	Rango MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	AP	0,25 - 1
	IT	0,06 - 0,25
	FL	2 - 8
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	AP	0,25 - 2
	IT	0,12 - 0,5
	FL	16 - 64

Anexo 2. Actividad Enzimática

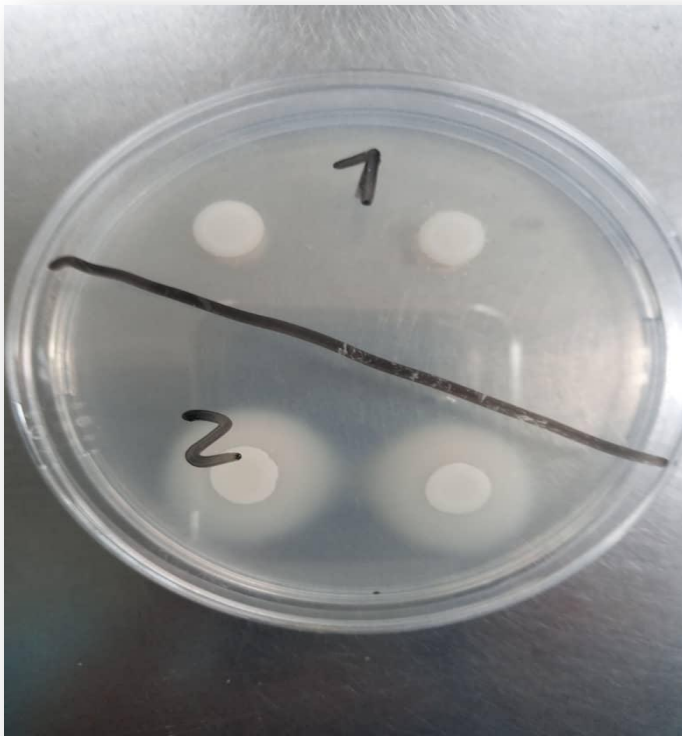


Fig 1. Actividad proteasa

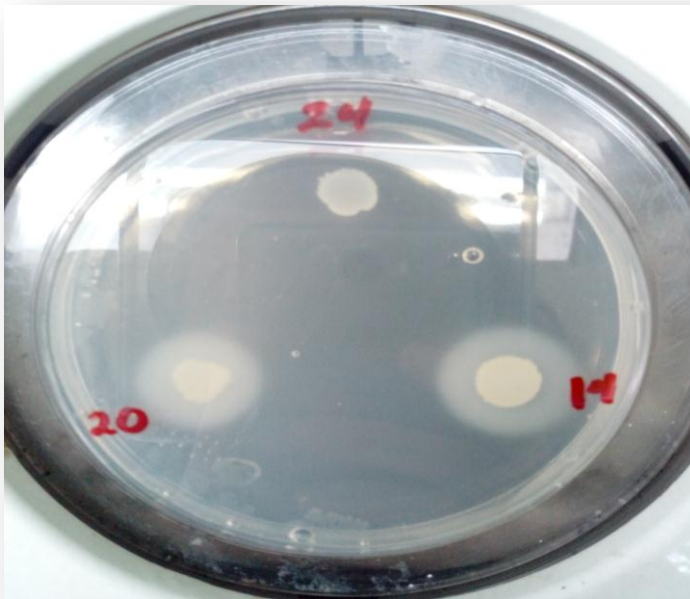


Fig 2. Actividad fosfolipasa

Anexo 3. Pruebas de susceptibilidad

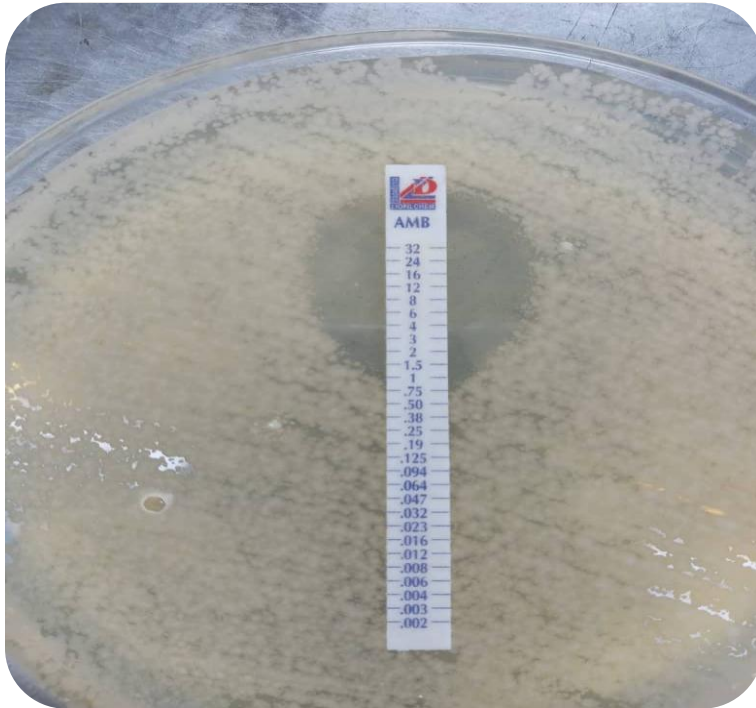


Fig 1. Foto de Etest para la determinación de la CMI frente Anfotericina B

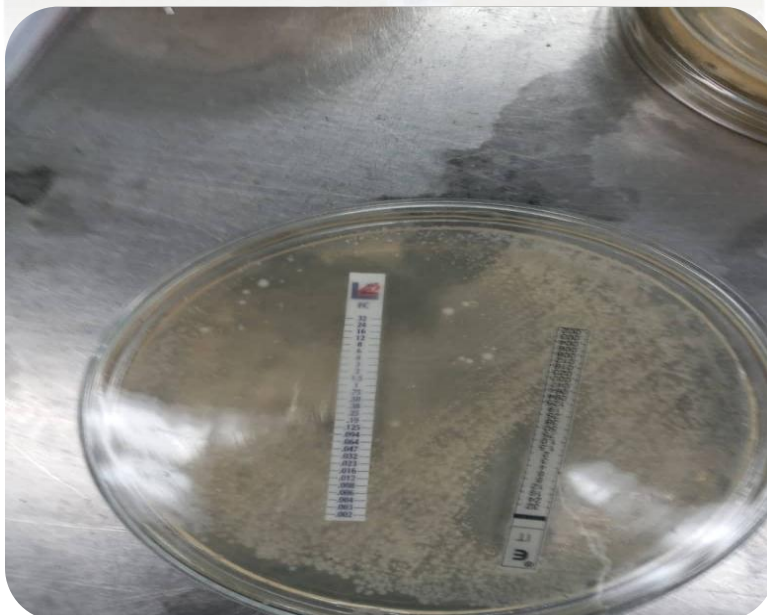


Fig 2. Foto de Etest para la determinación de la CMI frente a itraconazol y fluconazol