

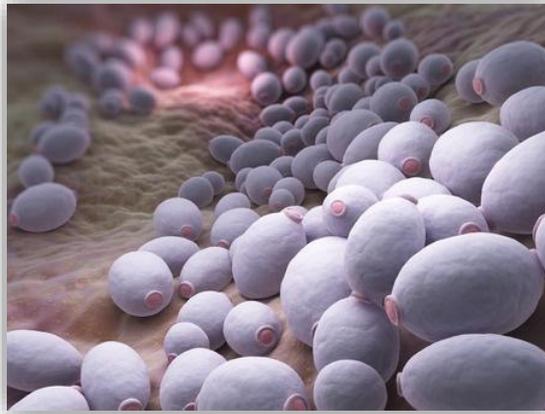
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

SUBDIRECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA

DEPARTAMENTO BACTERIOLOGÍA- MICOLOGÍA

**Susceptibilidad a antifúngicos y factores de virulencia en
aislados de *Candida* spp. responsables de otomicosis HCQ
"Manuel Fajardo" 2015**

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



Autor: Dr. Javier Martínez Alfonso

La Habana 2018

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

SUBDIRECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA

DEPARTAMENTO BACTERIOLOGÍA- MICOLOGÍA

**Susceptibilidad a antifúngicos y factores de virulencia en
aislados de *Candida* spp. responsables de otomicosis HCQ
"Manuel Fajardo" 2015**

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

Autor: Dr. Javier Martínez Alfonso

Tutores: Dr. Gerardo Martínez Machín. MSc

Lic: Carlos Fernandez Andreu. DrC

Asesora: Lic: Mayda Perurena Lancha. MSc

La Habana 2018

DEDICATORIA

A mis hijos Sabri y Daviño

AGRADECIMIENTOS

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

A mis compañeros del laboratorio por formar parte de este momento.

A mis tutores: Dr. Gerardo Martínez Machín y DrC Carlos Fernández Andreu por sus conocimientos y experiencia en el curso de esta tesis.

A mi asesora: Lic. Mayda Perurena Lancha por su valiosa cooperación.

Al colectivo de trabajo del Departamento de Otorrinolaringología del Hospital Clínico Quirúrgico "Manuel Fajardo", en especial al Dr. Vidal Barbón Alfonso y a la Dra. Egllys Ravelo Miranda, por la colaboración prestada en la realización de este trabajo.

Al colectivo de trabajo del Departamento de Micología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", por la estancia agradable que me proporcionaron.

A Gise por su ayuda invaluable y desinteresada

A todos, Muchas gracias.

Contenido

I INTRODUCCIÓN	1
I.1 OBJETIVOS	4
II- MARCO TEÓRICO	5
II.1 Concepto de otomicosis	5
II.2 Aspectos epidemiológicos	5
II.3 Patogenia	6
II.4 Cuadro clínico	8
II.5 Diagnóstico	9
II.6 Tratamiento	10
II.7 Historia del género <i>Candida</i>	11
II.8 Algunas levaduras de importancia medica	12
II.8.1 <i>Candida albicans</i>	12
II.8.2 <i>Candida parapsilosis</i>	13
II.8.3 <i>Candida tropicalis</i>	14
II.8.4 <i>Candida glabrata</i>	14
II.9 Pruebas de susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i> de levaduras	14
II.10 Antifúngicos y mecanismos de resistencia	16
II.11 Factores de virulencia	19
II.12 Enzimas extracelulares	19
II.12.1 Proteineras	20
II.12.2 Fosfolipasas	20
II.12.3 Hemolisinas	21
III MATERIAL Y MÉTODO	22
III.1 Diseño general del estudio	22
III.2 Descripción de técnicas y procedimientos	22
III.2.2 Interpretación	23

III.3 Determinación de la susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i> para levaduras por el método de referencia	23
III.3.1 Lectura de los resultados (lectura visual)	23
III.3.2 Interpretación de los resultados	23
III.4 Técnicas y procedimientos para la determinación de los factores de virulencia.	24
III.4.1 Preparación del inóculo	24
III.4.2 Detección de la actividad fosfolipasa	24
III.4.4 Determinación de la actividad hemolítica	26
III.5 Procesamiento y análisis de los resultados	26
IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
IV.1 Estudio de susceptibilidad	29
IV.1.1 Estudio de susceptibilidad frente a Fluocitosina	29
IV.1.2 Estudio de susceptibilidad frente a Anfotericina B	32
IV.1.3 Estudio de susceptibilidad frente a Fluconazol	35
IV.1.4 Estudio de susceptibilidad frente a Itraconazol	40
IV.1.6 Patrones de resistencia obtenidos en el estudio de susceptibilidad	44
IV.2 Estudio de la actividad enzimática	46
IV.2.1 Producción de enzima fosfolipasa	46
IV.2.2 Producción de enzima proteinasa	49
IV.2.3 Actividad hemolítica	51
IV.3 Correlación entre factores de virulencia y resistencia antifúngica	51
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

I Introducción

Las infecciones micóticas y la diversidad de hongos patógenos han aumentado dramáticamente en los últimos años ⁽¹⁾ y con ello, se han incrementado los casos de otitis externas. Asociados sobre todo a la utilización de antibióticos de amplio espectro, uso de aparatos de amplificación sonora individual, uso de prótesis auditivas, trauma autoinducido, práctica de natación, infecciones bacterianas, uso de corticoides y citostáticos, neoplasias, alteraciones inmunitarias o enfermedades debilitantes que tornan al hospedero susceptible ⁽²⁻⁴⁾; quizás también por un mayor índice de sospecha y a la mejoría de las técnicas empleadas para diagnosticarlas ⁽⁵⁾.

La Organización Mundial de la Salud plantea que anualmente 1,5 millones de personas presentan al menos un episodio de otitis externa ⁽⁶⁾ y se estima que estas constituyen del 5 al 20% de las consultas otológicas ^(7, 8). Del 9 al 25% de las otitis externas son causadas por hongos y se denominan otitis fúngicas u otomicosis ^(3, 9).

Otomicosis (del griego Oto = oído + micosis = infección fúngica) es una patología extendida por todo el mundo y bastante frecuente, pero existen pocos estudios al respecto y no se dispone de suficiente información sobre su incidencia real ^(7, 8). La frecuencia y la proporción de los hongos que la producen varían de acuerdo al área geográfica; *Candida* es de los géneros usualmente predominantes ^(4, 10, 11).

Las enfermedades producidas por *Candida* tienen un amplio rango, van desde infecciones mucocutáneas hasta infecciones sistémicas ^(12, 13). Este género es considerado el hongo más aislado en pacientes con cáncer, la segunda causa de infección del tracto urinario asociada al catéter, el tercer patógeno productor de sepsis en edades pediátricas y finalmente, la cuarta causa de fungemia de origen nosocomial asociada a una alta tasa de mortalidad ⁽¹³⁾.

Las infecciones superficiales afectan la piel o las membranas mucosas y se tratan con drogas antifúngicas tópicas. Las infecciones invasivas en ocasiones

son mal tratadas, debido sobre todo a un ineficiente método diagnóstico y a una terapia antifúngica empírica ⁽¹⁴⁾.

C. albicans continua siendo el agente de candidiasis aislado con más frecuencia, sin embargo, otras especies son una parte importante de los aislamientos clínicos recolectados en los hospitales en todo el mundo. Las especies diferentes a *C. albicans* de mayor importancia clínica incluyen: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* y con menos frecuencia se aíslan *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. kefyr*, *C. famata*, entre otras ⁽¹²⁾.

Existe una significativa variación geográfica en la frecuencia de aislamiento de las diferentes especies no albicans ⁽¹⁵⁾. *C. glabrata* es más preponderante en Norte América y América Latina, *C. tropicalis* en Asia- Pacífico, *C. parapsilosis* en Norte América y *C. guilliermondii* en América Latina ⁽¹²⁾.

La emergencia de la resistencia a los antifúngicos usados con más frecuencia en las especies de *Candida*, en particular en las no albicans, constituye también un problema universal. Esto incrementó los fallos en los tratamientos y los riesgos de mortalidad, además de prolongar la estadía hospitalaria y acrecentar la aparición de complicaciones en los pacientes ⁽¹³⁾. La resistencia también varía de un área geográfica a otra, por lo que es importante para el clínico conocer los perfiles locales de resistencia antes de iniciar la terapia ⁽¹⁵⁾. Por eso en el manejo del paciente con enfermedades por *Candida*, las pruebas de susceptibilidad antifúngica son un importante paso para la selección del tratamiento apropiado ⁽¹⁶⁾. La resistencia a los antifúngicos en aislados de *Candida* provenientes de otomicosis ha sido poco estudiada, y se le ha dado preferencia al estudio de aquellos aislados obtenidos de infecciones invasivas y de infecciones en otros órganos.

Por otro lado, la presencia de factores de virulencia determina el potencial patogénico de cualquier microorganismo. *Candida* posee factores de virulencia tales como: hemolisinas, fosfolipasas, proteinasas y formación de biopelícula entre otros ⁽¹⁷⁾. Su expresión permite que *Candida* pase de ser un comensal exitoso a ser un agente patógeno con capacidad de infectar otros órganos ⁽¹⁸⁾. Existen pocos informes nacionales e internacionales que se refieran a la

importancia de los factores de virulencia en la patogenia de la otomicosis, aunque algunos autores han descrito la acción de la proteinasa como un elemento fundamental en la infección del oído ^(19, 20).

En cuanto a la relación que existe entre los factores de virulencia y la resistencia antifúngica, a diferencias de los reportes existentes en estudios con bacterias ^(21, 22), son escasas las publicaciones que investigan esta conexión.

En informe previo del autor del presente estudio se comprobó la alta sensibilidad de 25 aislados de *Candida* provenientes de pacientes con otomicosis (96%) a los antifúngicos presentes en el método comercial ATB FUNGUS 3. En la presente investigación se realizará el estudio de susceptibilidad a 19 de estos aislados, usando esta vez el método de referencia para corroborar esos resultados, obteniendo la CMI de cada antifúngico y sumando el ketoconazol, antifúngico con presentación de uso tópico no presente en el método comercial nombrado con anterioridad y presente en el cuadro básico de medicamentos de Cuba ⁽²³⁾. También se determinarán la presencia de fosfolipasas, proteinasas y hemolisinas como factores de virulencia presentes en estos aislados y su relación con los resultados obtenidos en el estudio de susceptibilidad. Esta investigación tendrá gran valor porque contribuirá al conocimiento de los perfiles locales de resistencia, así como la capacidad patogénica de estos aislados de *Candida* responsables de otomicosis, los que representan una muestra de las especies de *Candida* que circulan en la población atendida en el HCQ "Manuel Fajardo" y a partir de los cuales se puede inferir que riesgo pudieran representar para la salud pública.

I.1 Objetivos

Determinar la concentración mínima inhibitoria de los antifúngicos de interés frente a los aislados de *Candida*.

Comparar los resultados de los estudios de susceptibilidad antifúngica obtenidos mediante el método comercial con los del método de referencia.

Identificar la presencia de fosfolipasas, proteinasas y hemolisinas en los aislados de *Candida* y su relación con los resultados del estudio de susceptibilidad antifúngica.

II- Marco teórico

II.1 Concepto de otomicosis

Otomicosis es una infección fúngica superficial aguda, subaguda o crónica del conducto auditivo externo (CAE) y la aurícula ⁽²⁴⁾. Los microorganismos responsables de esta entidad clínica son generalmente hongos APSrófitos ambientales, especialmente *Aspergillus niger* ^(25, 26), también se aíslan con frecuencia levaduras ⁽¹⁰⁾ y en ocasiones dermatofitos ^(24, 25). El hongo usualmente afecta un tejido susceptible previamente afectado por infecciones bacterianas, injuria física o excesiva acumulación de cerumen, con tendencia a la recurrencia ^(27, 28).

Sinonimia: Otitis micótica externa ⁽²⁹⁾, infección fúngica del oído, oído del nadador ⁽³⁰⁾, miringomicosis ^(29, 30), otitis externa maligna fúngica, otitis externa fúngica necrotizante, otitis externa fúngica invasiva y otitis media fúngica ⁽²⁴⁾.

II.2 Aspectos epidemiológicos

Se estima que aproximadamente entre el 5 y el 25% de los casos de otitis externa son de etiología fúngica ^(3, 31), otros estudios reportan menos casos ^(32, 33).

Siendo esta patología de distribución mundial ⁽³⁾, además del calor y la humedad ^(25, 31, 32), el ambiente con considerable polvo del trópico y regiones subtropicales hacen que esta sea más frecuente en estas zonas geográficas ^(31, 34). Las infecciones mixtas son generalmente escasas pues la infección fúngica suele inhibir a la bacteriana ^(8, 35).

La otomicosis afecta al 10% de la población alguna vez en su vida ⁽²⁸⁾ por lo que representa un riesgo en la función del oído interno y por ende en la capacidad de oír ⁽⁵⁾. Es más frecuente entre la segunda y tercera década de la vida, entre individuos de bajo nivel socioeconómico y que viven en condiciones de higiene deficiente ⁽¹¹⁾. La alta incidencia que se reporta en adultos jóvenes puede ser atribuida al hecho de que estas personas están más expuestas a los micelios, algo que no pasa con las personas ubicadas en los grupos extremos

de edad ⁽²⁸⁾. La distribución por sexos es la misma ^(30, 35) aunque algunos autores refieren que es más frecuente en mujeres ⁽²⁹⁾ y se notifican más casos en las áreas rurales ^(7, 8).

Varios factores predisponentes se señalan como fundamentales para padecer esta enfermedad: inmunodepresión ^(32, 34), uso de esteroides ⁽³³⁾, uso de antibióticos tópicos ^(31, 32), uso de aparatos de amplificación sonora individual y de prótesis auditivas, trauma autoinducido (con bastonetes para la limpieza de oídos), baños en piscinas ^(11, 25), uso de aceites en los oídos, embarazo ⁽³⁴⁾, instrumentación de los oídos ^(28, 31, 32), enfermedades dermatológicas ⁽³⁶⁾ y malnutrición en niños ^(11, 37). El riesgo de otitis externa, bacteriana y fúngica es reportado cinco veces más en nadadores que en no nadadores ^(24, 38).

II.3 Patogenia

Los hongos son abundantes en el suelo y en la materia orgánica en descomposición. Estos elementos son rápidamente desecados bajo el sol del trópico y flotan en el viento como pequeñas partículas de polvo ⁽⁴⁾. Las esporas de los hongos son llevadas por los vapores de agua, un hecho que está correlacionado con las altas tasas de otomicosis en la India con la llegada del monzón, durante el cual la humedad relativa alcanza cifras de un 80%⁽⁴⁾.

Estos hongos se desarrollan sobre una superficie epitelial previamente dañada, se reproducen en estado asexual y generan colonias que se agrupan y forman masas o tapones de filamentos ⁽²⁹⁾.

La piel del CAE tiene un mecanismo de descamación y autolimpieza que dura de 6 a 12 semanas, la obstrucción del drenaje de glándulas sebáceas hacia el folículo piloso y de este al CAE como respuesta inflamatoria al incremento de temperatura y humedad ambiental, son el principal factor en la patogenia de la otitis externa ⁽³⁸⁾.

Los factores de protección en esta área, que es húmeda y oscura son: integridad de la piel, producción de cerumen, la microbiota, el pH ácido y la inmunidad general ⁽³⁸⁾.

Los nadadores presentan con frecuencia otitis externa bacteriana aguda y otomicosis. El calor, la humedad y el agua causan inflamación del estrato corneo de la piel, esto incrementa la maceración de la piel en el CAE y a la vez aumenta la destrucción de la barrera protectora de cerumen y crea las condiciones apropiadas para la infección bacteriana y más tarde para el crecimiento de los hongos ⁽²⁴⁾. La higiene deficiente en piscinas conteniendo aguas contaminadas está relacionada con el aumento de la incidencia de otomicosis ^(24, 39).

El CAE tiene una microbiota normal o comensal formada por una serie de microorganismos entre los que se incluyen gran variedad de bacterias: *Corynebacterium*, *Bacillus*, cocos gram positivos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus*, *micrococcus* no patógenos), bacilos gram negativos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*) y hongos filamentosos del género *Aspergillus* o levaduriformes sobre todo *Candida*. Esta flora comensal no es patógena mientras se mantenga el equilibrio entre bacterias y hongos ⁽⁸⁾. Es probable que luego de que la infección micótica se instale, se modifique la microbiota del oído medio ⁽⁵⁾.

Diversos factores influyen en la transformación de hongos APSrofitos a hongos patógenos y no son del todo conocidos. Se han considerado como favorecedores de infección: alteraciones de epitelio de revestimiento (enfermedades dermatológicas, microtraumatismos) ^(3, 8), aumento de pH del CAE ^(3, 8, 29), alteración cualitativa y cuantitativa del cerumen ^(3, 8, 29), factores sistémicos (alteraciones inmunitarias, enfermedades debilitantes, corticoides, antibióticos, citostáticos, neoplasias), factores ambientales (calor, humedad excesiva), antecedentes de otitis externas bacterianas, otitis medias crónicas perforadas, cavidades mastoideas postcirugía, instilación en el oído de sustancias oleosas o antibioticoterapia de amplio espectro ^(3, 8). Estas condiciones aisladas o combinadas, promueven el crecimiento de los hongos ⁽²⁹⁾.

II.4 Cuadro clínico

Puede evolucionar de forma aguda, subaguda o crónica ^(2, 35). Afecta el epitelio escamoso del CAE ^(33, 40), de forma infrecuente puede afectar la membrana timpánica ^(29, 30), el oído medio, las cavidades abiertas de mastoidectomía ⁽⁴⁾ y el hueso temporal ⁽⁴¹⁾. Se caracteriza principalmente por prurito ^(3, 33), sensación de oído ocupado ^(29, 35), otalgia ^(33, 35), hipoacusia ^(10, 33), tinnitus ^(1, 11), otorrea y disminución de la audición ^(4, 41). Afecta al oído medio si la membrana timpánica es perforada ^(1, 3, 11). Usualmente es unilateral ^(33, 42, 43), pero ocasionalmente se diagnostica de forma bilateral, principalmente en pacientes inmunocomprometidos ^(4, 43), la recurrencia es frecuente ^(4, 33).

Entre los principales signos que se obtienen durante la exploración física que permiten sospechar otomicosis están el hallazgo de micelios cubriendo el conducto auditivo externo y la membrana timpánica, descritos como papel secante ⁽²⁹⁾ o periódico húmedo, principalmente cuando se trata de hongos filamentosos ⁽⁵⁾.

La otomicosis sintomática aguda presenta un gran componente inflamatorio y se acompaña de otalgia moderada y secreción serosa. En la otoscopia se puede observar la presencia de placas aterciopeladas o con aspecto de fieltro blanquecino, con ocasional punteado blanco, verde, marrón o negro, separadas de la epidermis por una capa de secreciones y descamación. El epitelio subyacente está hiperémico, ulcerado y es muy doloroso al tacto. En casos aislados, se detecta hipoacusia a consecuencia de la obstrucción del conducto por un grueso ovillo miceliar ⁽⁷⁾.

La otomicosis sintomática crónica se caracteriza por dermatitis pruriginosa, discreta secreción serosa inodora, incolora o amarillenta, escozor y descamación seca. El examen del conducto auditivo externo revela una otitis externa exudativa con descamación blanquecina o depósitos amarillentos, recubriendo un epitelio hiperémico o incluso con zonas hemorrágicas. En ocasiones, puede observarse una miringitis granulosa, caracterizada por granulaciones timpánicas en "gotas de rocío", duras, de coloración rosada y bordes mal definidos, que sangran fácilmente ⁽⁷⁾.

Se ha descrito y con una incidencia creciente, parálisis del nervio facial con invasión del tejido conectivo en pacientes inmunocomprometidos como una forma de otitis fúngica maligna, entre este grupo de pacientes se ha visto con más frecuencia la perforación de la membrana timpánica y la presentación, aunque poco frecuente, de la diseminación fúngica por vía hematológica hacia el hueso temporal ^(28, 35, 44).

II.5 Diagnóstico

El diagnóstico de esta entidad requiere de un alto grado de sospecha por parte del médico ya que no presenta un cuadro clínico específico y debe ser acompañado de confirmación microbiológica ^(4, 28, 32).

Se hace con la historia clínica, examen físico e identificación por el laboratorio de microbiología de los hongos aislados en el proceso. El diagnóstico de laboratorio incluye microscopía directa, cultivo, e histopatología ⁽²⁴⁾. Este se hace poniendo en evidencia la presencia del agente causal en el material obtenido del CAE con un frotis o un hisopado. Hifas o levaduras y a veces, en el caso de *Aspergillus* spp, la presencia de conidióforos (cabezas aspergilaes), alertan al médico sobre el diagnóstico, el cual debe ser confirmado por cultivo⁽⁴⁵⁾.

En ocasiones el diagnóstico es realizado en la consulta médica, ya que las características del crecimiento de los hongos son fácilmente reconocibles al examen del conducto auditivo externo y el cultivo generalmente no se indica por no tener un adecuado costo-beneficio en aquellos escenarios clínicos que cuentan con menos recursos económicos ⁽⁴⁶⁾.

En el caso de hongos filamentosos (pero sobre todo en el de levaduras), la apariencia del conducto no siempre sugiere el diagnóstico, por lo que para descartar la presencia de agentes micóticos, deben realizarse examen microscópico directo y cultivo a todos los pacientes con otitis externa crónica que no responden a tratamiento convencional. Igual medida debe tomarse en casos de combinación de otitis media crónica con otorrea rebelde a tratamiento. Tanto en infecciones por hongos filamentosos como por levaduras, lo correcto es identificar al agente ⁽⁵⁾. Las muestras que usualmente se usan

para el diagnóstico de esta patología son restos de exfoliación del epitelio (escamas), cerumen y secreciones obtenidas mediante un hisopo ⁽³⁰⁾.

El examen directo microscópico de las muestras clínicas remitidas al laboratorio de micología puede: brindar un diagnóstico presuntivo, sugerir el medio de cultivo donde se puede sembrar y aislar al agente o confirmar un diagnóstico cuando el agente causal es difícil de cultivar ⁽⁴⁷⁾, además permitirá la instauración temprana de una terapia antifúngica ⁽⁴⁸⁾.

II.6 Tratamiento

El tratamiento estándar para la otomicosis aún no ha sido bien establecido; a pesar de que múltiples estudios *in vitro* han evaluado la eficacia de varios agentes antifúngicos, no existe un consenso general sobre cuál es el más efectivo ⁽³²⁾.

Debe ser acorde a la severidad de la infección, específico para el agente causal para evitar el desarrollo de resistencia y su eficacia debe ser confirmada con repetidos cultivos negativos ⁽²⁴⁾.

Los pacientes con infección superficial y colonización crónica deben ser tratados con desbridamiento y limpieza amplia del CAE combinado con drogas antifúngicas tópicas. El tratamiento sistémico no debe ser prescrito, excepto en casos de otitis maligna invasiva (aguda o crónica), otitis externa complicada por meningitis, mastoiditis o ambas ^(24, 32).

La aplicación del agente antifúngico apropiado acompañado de desbridamiento mecánico frecuentemente logra una pronta resolución de los síntomas, sin embargo la recurrencia y la enfermedad residual son frecuentes ^(32, 33).

La limpieza o lavados se hacen con soluciones aciduladas que permiten restaurar adecuadamente el pH ligeramente ácido de la piel como son: soluciones de alcohol boricado, ácido acético al 2-4%, violeta de genciana, nitrato de plata ^(38, 49).

Las gotas fungicidas son la forma más popular de tratamiento, el clotrimazol tiene efecto antibacteriano y esto es una ventaja cuando se trata de infecciones mixtas; cremas fungicidas con fluconazol o ketoconazol también pueden ser aplicadas. La preparación con tolnaftato es efectiva para *Candida*, al igual que la nistatina, pero el uso de esta última es más ventajoso ya que no se absorbe por la piel intacta, la nistatina no está disponible en preparaciones óticas, sin embargo, se pueden hacer soluciones o suspensiones para su uso en la otomicosis ⁽³¹⁾.

En pacientes con varias recidivas hay que evaluar la posibilidad de la existencia de enfermedades crónicas (diabetes mellitus, infección por V.I.H, otros) ⁽³⁸⁾.

II.7 Historia del género *Candida*

Hipócrates (460 a 377 a.C) describió placas blanquecinas en la boca de pacientes debilitados y en recién nacidos. Galeno (130 a 200 d.C) las observó en niños enfermizos. En 1839, Bernhard Rudolf Conrad von Langenbeck realizó el descubrimiento del organismo causal al aislar un hongo en un paciente con aftas. J.H. Bennett, en 1844 en Edimburgo, aisló el hongo conocido hoy día como *Candida albicans* y en 1846 E.T. Berg, en Estocolmo, reconoció las enfermedades debilitantes como el principal factor predisponente. En 1890, Christian Georg Shmorl informó la afección mucocutánea, En 1904, E. Dubendorfer, la inguinal y en 1907, Jacobi, la cutánea. Durante la primera mitad del siglo xx se identificaron todas las demás localizaciones. En 1954, en el VII Congreso de Botánica se aceptó de manera oficial el género *Candida*. En 2005, A. Tavanti, D. Davidson y N.A.Gow describieron el complejo *C. parapsilosis* ⁽⁵⁰⁾.

Varias especies de levaduras del género *Candida* están distribuidas ampliamente en la naturaleza y actúan como APSrófitos de la microbiota del ser humano, sin embargo, algunas de estas especies de hongos pueden realizar una transición a patógenos oportunistas, transición inducida por alteraciones en las defensas del huésped. *Candida* rara vez produce enfermedad en pacientes saludables pero toma ventaja de alteraciones locales

o generales del sistema inmune causando un grupo de enfermedades llamadas candidiasis. Estas enfermedades se pueden subdividir en tres grandes grupos: cutáneas (piel y faneras), mucocutáneas (orofaríngea, esofágica y vulvovaginal) y sistémicas (candidemia y otras formas de candidiasis invasiva). La candidiasis cutánea y mucocutáneas es frecuente en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la presentación orofaríngea y la vulvovaginal se observa con más frecuencia en infantes inmunocompetentes y mujeres jóvenes y la candidemia en pacientes con cáncer y en pacientes trasplantados con tratamiento inmunosupresor. La candidiasis representa la cuarta causa de infección nosocomial, entre un 8 y 10%, y la mortalidad por candidiasis sistémica permanece alta, entre un 15 y 35%, dependiendo de la especie infectante ⁽¹²⁾.

II.8 Algunas levaduras de importancia medica

Taxonomía:

Reino: Eumycota.

División Ascomycota.

Clase: Hemiascomycetes.

Orden: Sacharomycetales.

Familias: Saccharomycetaceae, Endomycetaceae, Metschnikowiaceae, Lipomycetaceae

Especie: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. ciferri*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyri* entre otras.

C. albicans, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* causan el 95% de las infecciones causadas por *Candida* ⁽⁵¹⁾.

II.8.1 *Candida albicans*

Es un hongo polimórfico ⁽⁵¹⁻⁵⁴⁾, forma parte de la microbiota humana, en la mayoría de las personas reside por toda la vida siendo un comensal, pero bajo ciertas circunstancias, puede causar infecciones que pueden ir desde infecciones superficiales a infecciones sistémicas que pongan en peligro la vida ^(52, 53), siendo el agente asociado con más frecuencia a la candidiasis invasiva ⁽⁵⁵⁾. Es de los agentes fúngicos patógenos humanos más prevalentes

y dependiendo de las condiciones ambientales es capaz de crecer en distintas formas celulares ^(52, 54).

La habilidad de *C.albicans* para infectar nichos diversos de un mismo hospedero está dada por que posee un amplio rango de factores de virulencia: transición morfológica entre levadura e hifas, expresión de adhesinas, invasión de las células epiteliales, formación de biopelícula ^(53, 56) y secreción de enzimas hidrolíticas, también se pueden considerar factores de virulencia la rápida adaptación a las variaciones ambientales: pH, flexibilidad metabólica, un poderoso sistema de adquisición de nutrientes y una robusta maquinaria de respuesta al estrés ⁽⁵³⁾.

II.8.2 *Candida parapsilosis*

En comparación con otras especies de *Candida*, *C. parapsilosis* tiene una amplia distribución en la naturaleza, no es un patógeno humano obligado y se ha aislado de diferentes fuentes entre las que se encuentran: animales domésticos, insectos, suelo y ambientes marinos. Es un comensal humano ^(57, 58) y uno de los hongos que se aíslan con más frecuencia del espacio subungueal de las manos. Su patogenicidad está limitada por la integridad de los tegumentos, es notoria su capacidad para crecer en las soluciones usadas para alimentación parenteral, de formar biopelícula en catéteres y otros implantes, su persistencia en ambientes hospitalarios ^(51, 57) y el aumento del número de casos en neonatos ⁽⁵¹⁾.

En las décadas pasadas la incidencia de *C. parapsilosis* aumentó dramáticamente, la mayoría de las veces se le describe como la segunda especie de *Candida* aislada con más frecuencia en hemocultivos^(51, 57) y en algunos hospitales de Europa, Asia y Sur América ha ocupado el primer lugar ^(57, 58). En el 2005, estudios genéticos revelaron la existencia de diferencias importantes en aislados de *C. parapsilosis* que permitieron dividir a esta levadura en tres especies relacionadas estrechamente entre sí: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*; sin embargo *C. parapsilosis* es responsable de la mayoría de las manifestaciones clínicas ⁽⁵⁷⁾.

II.8.3 *Candida tropicalis*

Es la segunda o tercera especie más aislada entre las especies de *Candida* no *albicans*. Ha sido aislada en pacientes con cáncer, específicamente leucemia, pacientes neutropénicos, o que hayan recibido trasplantes de medula ósea ⁽⁵⁹⁾, es más invasiva que *C. albicans* y se estima que el 50-60% de los pacientes con factores predisponentes desarrollan candidiasis invasiva cuando son colonizados ⁽⁶⁰⁾. Observaciones clínicas y experimentales sugieren que las tasas de morbilidad y mortalidad producidas por *C. tropicalis* son más altas que las producidas por *C. albicans*, estos hallazgos sostienen la hipótesis de que existe algún mediador secretado por esta levadura que produce una deficiencia más pronunciada de células T que la que produce *C. albicans* ⁽⁵⁹⁾.

II.8.4 *Candida glabrata*

Inicialmente clasificada en el género *Torulopsis* debido a que no produce pseudohifas, en 1978 se consideró que el crecimiento polimórfico no era una característica distintiva del género *Candida* por lo que se sugirió que *Torulopsis glabrata* fuera incluida dentro de este como *C. glabrata* por su patogenicidad⁽⁶¹⁻⁶³⁾. Marcadamente más pequeña que otras especies de *Candida* ⁽⁶¹⁾, su incidencia es alta en adultos y baja en niños y aún más baja en neonatos ⁽⁵¹⁾. Su genoma es haploide (*C. albicans* es diploide), lo cual facilita la rápida adquisición de resistencia secundaria a azoles ⁽⁶²⁾. Históricamente considerada no patógena, con el uso de la terapia antifúngica de amplio espectro, la frecuencia de infecciones superficiales y profundas por este agente ha aumentado significativamente en los últimos años, por lo que se considera un patógeno emergente ^(62, 63). Se aísla tanto en infecciones intrahospitalarias como en infecciones superficiales, afecta a pacientes inmunocomprometidos o debilitados, se asocia al uso de antibacterianos y antifúngicos como fluconazol y puede ser portada en las manos del personal médico ⁽⁶²⁾.

II.9 Pruebas de susceptibilidad antifúngica *in vitro* de levaduras

Los estudios de susceptibilidad a antifúngicos anteriores al uso de los métodos estandarizados eran inconsistentes y muy poco reproducibles, por los diversos factores que influyen en estos ensayos, como el tamaño del inóculo, la

composición y pH del medio, formato de la prueba y temperatura de incubación⁽⁶⁴⁾. En 1992 el *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, actualmente *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) en Estados Unidos de América (EUA) elaboró el primer estándar internacional para susceptibilidad de levaduras. Este documento (M27-A) permitió medir las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) *in vitro* de las principales especies de levaduras oportunistas ^(64, 65).

En la actualidad se dispone de dos estándares que utilizan el método de microdilución en medio líquido con este propósito. Uno es el documento M27-A3, del CLSI que ha establecido puntos de corte para definir susceptibilidad *in vitro* a determinados antifúngicos como los azoles y el otro es el estándar europeo, *Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testin* (AFST) del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), documento EDef 7.2, que ha demostrado ser equivalente al estándar CLSI en levaduras no fermentadoras. La disponibilidad de estas metodologías ha hecho posible el estudio de los mecanismos de resistencia y de resistencia cruzada en *Candida* spp., ha permitido develar la relación entre mutaciones genéticas, CMI y datos clínicos y se han definido los puntos de cortes (PC) en la práctica clínica así como los puntos de cortes epidemiológicos (PCE) ⁽⁶⁶⁾. Se ha demostrado que estos métodos (EUCAST y CLSI) pueden ser usados con efectividad en la vigilancia de la resistencia a los antifúngicos en *Candida* spp.^(65, 67). El método de difusión en disco, estandarizado por el CLSI en el documento M44-A para *Candida* spp. brinda un halo de inhibición cuya medición correlaciona muy bien con el método de referencia ^(64, 68).

Existen métodos comerciales que presentan buena concordancia con los métodos de dilución en medio líquido, uno de los más utilizados es el Etest (AB BioDisk, Solna, Suecia) para susceptibilidad *in vitro* de *Candida* spp. frente a fluconazol (FCZ) e itraconazol (ITZ), método simple en el que se inocula el hongo en la superficie de un agar seguido de la aplicación de una tira plástica impregnada con un gradiente de concentración del antifúngico lo cual permite determinar CMI, siendo este método uno de los más eficaces para la determinación de resistencia a anfotericina B (AMB) en *Candida* ⁽⁶⁴⁾.

Otros métodos comerciales, sencillos de realizar, que pueden ser una alternativa para uso de rutina en el laboratorio de microbiología clínica en el estudio de la sensibilidad de *Candida* spp. son ATB FUNGUS 3 panel (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia) y Sensititre YeastOne 3 (Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, Reino Unido) ⁽⁶⁹⁾, siendo este último el método comercial que se asemeja más a la metodología del CLSI, se basa en la microdilución en caldo pero con un sustrato cromogénico para facilitar la interpretación de la CMI ⁽⁶⁴⁾.

ATB FUNGUS 3 panel (BioMérieux, La Balme-les Grottes, Francia), consiste en una lámina con 16 pares de pocillos, dos pocillos para el control del crecimiento y el resto con cinco drogas antifúngicas a diferentes concentraciones: 5-fluorocitosina (5FC) (4-16 mg/mL), AMB (0.5-16 mg/mL), FCZ (1-128 mg/mL), ITZ (0.125-4 mg/mL) y el voriconazol (VRC) (0.06- 8 mg/mL) ⁽⁷⁰⁾. Este método puede ser utilizado con confianza en los laboratorios clínicos para determinar la sensibilidad de los aislados de *Candida* spp. a los antifúngicos. Para los aislados que fuesen resistentes o sensibles, dependientes de la dosis, se recomienda confirmar la sensibilidad por un método de referencia por dilución⁽⁷¹⁾.

El Vitek 2® (BioMérieux) es un método automatizado que utiliza una lectura espectrofotométrica y determina CMI, tiene la ventaja de encontrarse acoplado a la identificación de levaduras y los resultados pueden obtenerse a partir de las 10 a 26 horas de incubación ⁽⁶⁴⁾.

II.10 Antifúngicos y mecanismos de resistencia

Los azoles poseen actividad fungicida frente a *Aspergillus* spp. y actividad fungistática frente *Candida* spp., agentes incluidos en esta familia están los imidazoles: miconazol, econazol, clotrimazol y ketoconazol (KTZ) y los triazoles: FLZ, ITR, VRC y el posaconazol (POS) ⁽¹⁴⁾. El mecanismo de acción de los azoles frente a las levaduras involucra la reducción de la producción de ergosterol, uno de los principales componentes de la membrana de la levadura, bloqueando la actividad de la enzima lanosterol 14- α -desmetilasa ⁽¹⁴⁾, lo que inhibe el crecimiento de la célula ⁽⁷²⁾.

Uno de los mecanismos de resistencia más estudiados de las levaduras a estos medicamentos son la presencia de bombas de eflujo, estas producen una reducción significativa de la concentración intracelular de la droga por debajo de los niveles efectivos ⁽⁷³⁾, mecanismo este mediado por la sobreexpresión de genes que codifican para varios sistemas transportadores que incluyen diferentes estrategias y mecanismos para la expulsión del medicamento de la célula, entre los que se encuentran la superfamilia *ATP-binding cassette* (ABC), proteínas transportadoras primarias activas que pertenecen a la superfamilia *major facilitator* (MFS), proteínas transportadoras secundarias ⁽⁷⁴⁾.

El sistema ABC puede ser agrupado dentro de cinco conocidas subfamilias: PDR (*pleiotropic drug resistance*); MDR (*multidrug resistance*); MRP (*multidrug resistance-associated protein*); RLI (*RNase L inhibitor*)/ALDP (*adrenoleukodystrophy protein*) y YEF3 (*yeast elongation factor EF-3*) ⁽⁷⁴⁾, la acción de este sistema trae como consecuencia el aumento de los valores de la CMI ⁽⁷³⁾. Otros mecanismos de resistencia a los azoles son: modificación de la diana sobre la cual actúan; producción de enzimas que inactivan o degradan las drogas en el exterior de la célula fúngica e impermeabilidad de la membrana celular ⁽⁷⁵⁾. *C. krusei* es intrínsecamente resistente a FLZ y susceptible a VRC y POS ^(76, 77).

AMB pertenece a la familia de los polienos, estos se unen a los esteroides de la membrana (fundamentalmente ergosterol) y esta unión genera la formación de canales por los que la célula fúngica pierde iones y moléculas carbonadas ^(72, 78, 79). Se mantiene como fármaco de primera línea en el tratamiento de las infecciones fúngicas invasoras por tener un perfil de actividad muy amplio y efectividad alta; muy pocas especies muestran resistencia intrínseca (*Scedosporium* spp., *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *A. terreus* y *A. flavus*) ^(72, 80). AMB es un fármaco fungicida tanto para levaduras como para hongos filamentosos ^(78, 79).

La resistencia a AMB se ha descrito en levaduras y hongos filamentosos, pero sus mecanismos no están claros. En levaduras la mutación del gen *ERG3* que

codifica la enzima C-5, 6 esterol desaturasa, implicada en la síntesis de ergosterol, confiere resistencia moderada ⁽⁷²⁾

5FC es el único antifúngico de uso clínico perteneciente a la clase de las pirimidinas; por su limitada actividad se ha ido reduciendo su uso y en la actualidad apenas se utiliza, es un fármaco fungistático que penetra en la célula fúngica tras contactar con una proteína de membrana llamada citosina permeasa, en el interior de la célula es desaminada a 5-fluoracilo que tras varias modificaciones se convierte en ácido 5-fluoruradilico, el cual se incorpora a la cadena de ácido desoxirribonucleico (ARN), lo que ocasiona la producción de ARN aberrante y la inhibición celular ^(78, 79). Algunas cepas de *Candida* muestran resistencia primaria; cuando se utilizan en monoterapia genera resistencia secundaria con facilidad por lo que se recomienda su utilización en terapias combinadas con otros antifúngicos ⁽⁷⁹⁾. La resistencia primaria se debe a mutaciones en el gen que codifica la citosina deaminasa, enzima que convierte el antifúngico en fluoracilo ⁽⁷⁸⁾.

El estudio de la resistencia a los antifúngicos se ha basado en la determinación de los puntos de corte clínicos y en menor grado por la determinación de los valores de corte epidemiológicos, siendo estos últimos, en *Candida* spp, generalmete mas bajos que los puntos de corte clínicos ⁽⁶⁶⁾.

Los procedimientos para el estudio de la sensibilidad in vitro de las levaduras han sido ajustados por el CLSI en los últimos 5 años, los principales cambios son: obtención de la CMI a las 24h de incubación si el crecimiento es suficiente para hacer la lectura, con mas de 48h se ha observado baja reproducibilidad y sobrestimación de la resistencia *in vitro* y puntos de corte específicos para cada especie, estos puntos de corte han servido para diferenciar un microorganismo como tratable o no tratable, estos ajustes se hicieron para el FCZ, VRC y las equinocandinas ^(66, 81). Para ITR, AMB y 5FC en levaduras estos puntos de corte no están disponibles pero recientemente se han definido valores de corte epidemiológicos basados en CMI recogidas en datos aportados por múltiples laboratorios ⁽⁶⁶⁾.

Estos puntos de corte se caracterizan por ser específicos para cada especie, por estar basados en un conjunto de datos epidemiológicos, farmacodinámicos y clínicos, y por ser revisados periódicamente según se va disponiendo de nuevos datos procedentes de estudio de epidemiología molecular y del análisis de su correlación clínica ⁽⁸¹⁾. Los puntos de corte epidemiológicos pueden utilizarse para interpretar los resultados de los estudios de sensibilidad en casos en que no exista suficiente información para establecer puntos de cortes clínicos (PCC), estos ayudan a separar la población normal sensible de un grupo de microorganismos de la población resistente ⁽⁸¹⁾. Pueden ser considerados el primer paso en la determinación de los PCC y su principal utilidad está dada en que permiten detectar la reducción de la susceptibilidad a los agentes de interés en el contexto de los programas de vigilancia de la resistencia ^(82, 83) y permiten diferenciar las cepas salvajes de aquellas que ya han adquirido algún mecanismo de resistencia ⁽⁸³⁾.

II.11 Factores de virulencia

La patogenicidad del género *Candida* es mediada por un número de factores de virulencia dentro de los que se incluyen adherencia, formación de biopelícula en el tejido de los hospederos así como en los dispositivos médicos, la habilidad para evadir las defensas del hospedero y la producción de enzimas hidrolíticas (proteasas, fosfolipasas y hemolisinas, etc.) ^(51, 84). Estos factores pueden variar según el tipo, el sitio y la naturaleza de las defensas del huésped. El delicado equilibrio entre el huésped y el hongo puede convertirse en una relación parásita y resultar en enfermedad grave. La interacción entre hongo y medio ambiente está afectada por su variabilidad antigénica, el cambio fenotípico y la transición dimórfica ⁽⁸⁴⁾.

En el presente estudio se describen de manera independiente solo aquellos factores de virulencia que son objetos de la investigación.

II.12 Enzimas extracelulares

Las enzimas se consideran determinantes de virulencia en *Candida* ya que tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos, así como inactivar las moléculas

útiles en la defensa del organismo ⁽⁸⁴⁾. La expresión de estos factores varían con la especie infectante, el origen geográfico, el sitio, el tipo de infección y la respuesta del hospedero ⁽⁸⁵⁾.

II.12.1 Proteinasas

En *Candida* se han descrito varios miembros de una gran familia de enzimas aspartil-proteinasas secretadas (APS), codificadas por los genes de la familia *APS*, la presencia de estos genes es única en las especies patógenas de *Candida* y proporciona al hongo un sistema proteolítico eficiente y flexible que puede garantizar su éxito como patógeno oportunista. El papel de dichas enzimas es esencial en las infecciones de mucosas en las fases iniciales, pero no cuando el hongo se ha infiltrado en los vasos sanguíneos. Las proteínas APS tienen funciones especializadas durante el proceso infeccioso e incluyen la digestión de moléculas proteínicas para adquirir nutrientes, digerir o distorcionar las membranas del huésped y facilitar la adhesión, la invasión a tejidos y la digestión de moléculas del sistema inmunitario ⁽⁸⁴⁾.

La matriz extracelular y las proteínas de superficie del huésped como queratina, colágeno, laminina, fibronectina y mucina son degradadas de manera eficaz al igual que varias proteínas de defensa como la lactoferrina salival, el inhibidor de proteinasa α macroglobulina, las enzimas del estallido respiratorio del macrófago y casi todas las inmunoglobulinas, inclusive la inmunoglobulina A de secreción, que es resistente a la mayoría de las proteasas bacterianas. La APS de *Candida* también puede actuar en las cascadas proteolíticas del huésped, como los precursores de la cascada de coagulación sanguínea que hidrolizan al precursor del endotelio-1 (péptidovasoconstrictor), al alterar la homeostasia vascular y activar la citocina proinflamatoria IL-1 β . Por lo tanto, esta enzima participa en la activación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria en las superficies epiteliales *in vivo*⁽⁸⁴⁾.

II.12.2 Fosfolipasas

Este grupo de enzimas digieren los fosfolípidos presentes en la membrana celular de las células del hospedero, provocan la lisis o alteraciones en la

superficie de estas facilitando la adherencia y permitiendo la entrada de las hifas al citoplasma ^(86, 87). *C. albicans* es el mayor productor de fosfolipasas, siendo la producción de esta enzima menor en las otras especies ⁽¹⁸⁾. Cuatro tipos de fosfolipasas han sido identificadas: A, B, C y D y son codificadas por dos genes, *PLB1* y *PLB2* ⁽⁸⁶⁾. La principal actividad fosfolipasa se debe a la expresión del gen *PLB1*. Dicha expresión está regulada por factores nutricionales, medioambientales (temperatura, pH) y la fase de crecimiento de la levadura ⁽⁸⁸⁾.

II.12.3 Hemolisinas

Existen variedad de estudios que abordan la producción de enzimas proteasas y fosfolipasas por varias especies de *Candida*, pero es poco lo que se sabe sobre la actividad hemolítica que pueden exhibir estos hongos ⁽⁸⁹⁾. Manns *et al* fueron los primeros que describieron esta actividad en *Candida* cuando observaron el crecimiento de esta en agar sangre enriquecido con glucosa ⁽⁹⁰⁾.

La capacidad hemolítica es un importante factor de virulencia que permite a los hongos del género *Candida* adquirir hierro de los tejidos del hospedero el cual es usado para el metabolismo, crecimiento e invasión durante la infección. El hierro es un elemento esencial para la mayoría de los organismos, unicelulares o multicelulares. En humanos, este metal se encuentra en algunas proteínas, incluidas la hemoglobina. La habilidad de *C. albicans* para utilizar esta proteína como fuente de hierro fue descrita por Mors *et al*. El primer paso de la infección por *C.albicans in vivo* involucra la unión del hongo a los eritrocitos a través de receptores del sistema del complemento, el segundo paso corresponde a la producción por *Candida* del factor hemolítico que induce la lisis de los eritrocitos, este factor con frecuencia incumbe a una manoproteína que se encuentra en la superficie del hongo. Sin embargo, a pesar de estos descubrimientos, el mecanismo y la base molecular de la hemólisis que produce *Candida* aún es desconocido ⁽⁹¹⁾.

III Material y método

III.1 Diseño general del estudio

Se realizó un estudio descriptivo analítico en el Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología (IPK) desde mayo 2017 hasta octubre 2018.

El universo estuvo constituido por 19 aislados clínicos de *Candida*, divididos según la especie, provenientes de pacientes con otomicosis.

Tabla III.1 Aislados de *Candida* por especies que se utilizaron en el estudio de susceptibilidad usando el método comercial ATB FUNGUS 3. IPK 2015

Especies	
<i>Candida parapsilosis</i>	n=12
<i>Candida albicans</i>	n=2
<i>Candida famata</i>	n=2
<i>Candida tropicalis</i>	n=3
Total	N=19

III.2 Descripción de técnicas y procedimientos

Los aislados preservados en el medio de conservación para levaduras (solución salina 0,9%) se inocularon por estrías en dos tubos de agar dextrosa Sabouraud (ADS) y se incubaron en aerobiosis a 37 °C de 36-72 horas. Las tapas de los tubos se ajustaron para que el cultivo tuviera una adecuada aireación. Una vez que se detectó crecimiento, se procedió a valorar el mismo y fueron considerados positivos aquellos en el que el examen macroscópico se observó un crecimiento coincidente con las estrías de inoculación y se obtuvieron colonias con morfología característica de hongos levaduriformes

III.2.1 Examen microscópico del cultivo

Se usó para cada cultivo un portaobjetos, se tomó una pequeña asada de la colonia y se diluyó en una gota de agua destilada y se observó al microscopio óptico a 10x⁽⁹²⁾.

III.2.2 Interpretación

Se evaluó la pureza del cultivo y la presencia de blastoconidias

III.3 Determinación de la susceptibilidad antifúngica *in vitro* para levaduras por el método de referencia

Se realizó siguiendo las pautas del método de microdilución en medio líquido, método de referencia indicado por el CLSI en el documento M27-A3⁽⁹³⁾. Para la confirmación de la técnica se usaron cepas controles pertenecientes a la colección de hongos patógenos del IPK (anexo 1). Los aislados se evaluaron frente a 5FC, AMB, FCZ, ITR y KTZ.

III.3.1 Lectura de los resultados (lectura visual)

Se observó la ausencia o presencia de un crecimiento visible en cada pocillo donde se inoculó el aislado y se comparó este con el pocillo donde se inoculó la cepa control. Para azoles y 5FC: la CMI fue la concentración más baja de antifúngico que produjo una reducción aparente del crecimiento de la levadura ($\geq 50\%$), comparada con el crecimiento control después de 48 h de incubación. Para AMB, la CMI fue la concentración más baja de antifúngico que inhibió el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produjo una reducción del 100% del crecimiento⁽⁶⁸⁾.

III.3.2 Interpretación de los resultados

Para FCZ se utilizaron los puntos de corte especie específicos brindados por el CLSI para *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (anexo 2).

Para *C. guilliermondii* y *C. famata* el CLSI no ha presentado puntos de corte especie específicos por lo que se tuvieron en cuenta los rangos de CMI recomendados por esta institución en el documento M27- A3⁽⁹³⁾.

Para el ITR el CLSI no ha brindado puntos de corte especie específicos para las diferentes especies de *Candida*, se tomaron en cuenta los rangos de CMI indicados por el CLSI (anexo 2)⁽⁹³⁾. Para 5FC se consideró sensible una CMI ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$, intermedio una CMI entre 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ y resistente una CMI ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ ⁽⁶⁸⁾.

La CMI para AMB se sitúa en un rango estrecho que oscila entre 0,25 a 1,0 µg/mL, cuando se obtienen CMI con valores mayores a 1 µg/mL en aislados de *Candida*, es probable que estos sean resistentes ⁽⁹³⁾.

Para el KTZ una CMI ≥ 4 µg/mL se consideró resistente ⁽⁹⁴⁾.

Al obtenerse estos resultados se compararon con los resultados obtenidos previamente en el estudio de susceptibilidad realizado con el método comercial ATB FUNGUS 3 y para comparar la concordancia entre ambos estudios se utilizó el índice de Kappa.

Se interpretaron los valores de Kappa (k) obtenidos tomando como referencia la siguiente escala ⁽¹⁰¹⁾.

Valoración del índice Kappa	
Valor de k	Fuerza de la concordancia
< 0,20	Pobre
0,21- 0,40	Débil
0,41- 0,60	Moderada
0,61- 0,80	Buena
0,81- 1, 00	Muy buena

III.4 Técnicas y procedimientos para la determinación de los factores de virulencia.

III.4.1 Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión en agua destilada estéril a partir de cultivos de 24 horas incubados a 37°C; su concentración se midió en cámara de Neubauer y se ajustó a 10^7 cel/mL ^(95, 96). Esta suspensión se empleó como inóculo en las siguientes pruebas para la evaluación de la actividad enzimática.

III.4.2 Detección de la actividad fosfolipasa

La actividad fosfolipasa se reveló mediante el uso de un medio agarizado suplementado con yema de huevo como fuente lipídica ⁽⁹⁵⁾ cuya composición fue la siguiente: Agar malta (BIOCEN, Cuba) 22,5 g, NaCl (Oxoid, Reino Unido) 29,2 g, CaCl₂ (Merck, Alemania) 0,28 g, emulsión de yema de huevo 10 mL y agua destilada 490 mL.

La emulsión de yema de huevo (5 mL de yema de huevo y 5 mL de agua destilada estéril) se añadió al resto de los componentes del medio previamente esterilizados en autoclave y enfriados por debajo de 50°C. Por último se homogenizó y dispensó en placas de Petri las cuales fueron inoculadas dejando caer 5 µL del inóculo preparado en las placas con el medio de cultivo, sin hacer estrías por agotamiento, ni siembra circular. Las placas se incubaron a 37°C durante 6 días. La formación de un halo de turbidez alrededor del sitio de inoculación de la colonia indicó actividad fosfolipasa. Los resultados se expresaron mediante el valor Pz, que es la relación entre el diámetro (en mm) de la colonia y el diámetro de la colonia más el halo de precipitación debido a la acción de la enzima sobre los fosfolípidos contenidos en el medio ^(95, 97). La actividad fosfolipasa se interpretó como positiva cuando la zona de precipitación se hizo visible alrededor del crecimiento y se establecieron los siguientes rangos de actividad (según el valor de Pz): 1 (negativo); 0,35-0,50 (alta producción); 0,51-0,74 (moderada producción) y 0,75-0,99 (baja producción) ⁽⁹⁵⁾. Los ensayos se realizaron por duplicado y como valor de la actividad enzimática se tomó el promedio de las dos medidas.

III.4.3 Detección de la actividad proteinasa

La actividad proteinasa se reveló en un medio agarizado rico en albúmina sérica bovina como fuente proteica ⁽⁹⁵⁾ y su composición fue la siguiente: Base de carbono para levaduras (Difco, EUA) 11,7 g, extracto de levadura (Difco, EUA) 0,1 g, albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, EUA) 2 g, agar 16 g y agua destilada 1000 mL.

El agar se disolvió en 800 mL de agua destilada y esterilizado en autoclave; una vez enfriado se le añadió el resto de los componentes esterilizados por filtración (0,22 µm). Por último se dispensó el medio en placas de Petri las cuales fueron inoculadas dejando caer 5 µL del inóculo en las placas con el medio de cultivo, sin hacer estrías por agotamiento, ni siembra circular. Las placas se incubaron a 37°C durante 6 días. La formación de un halo transparente alrededor de la colonia indicó actividad proteinasa. La actividad enzimática se midió como el diámetro del área lítica alrededor del crecimiento y se evaluó como no producción cuando no se hizo visible el área de lisis,

moderada producción cuando el diámetro del halo fue de 1-2 mm y alta producción cuando fue mayor de 2 mm ⁽⁹⁵⁾. Los ensayos se realizaron por duplicado y el valor de la actividad enzimática correspondió al promedio de las dos medidas.

III.4.4 Determinación de la actividad hemolítica

La actividad hemolítica fue evaluada siguiendo la metodología descrita por Luo *et al* ⁽⁸⁹⁾. Utilizando placas con agar Sabouraud suplementado con 3% de glucosa y 7% de sangre de carnero. Se inocularon 5 μ L de una suspensión de cada cepa ajustada al 1 en la escala de turbidez de Mac Farland (3×10^8 cels/mL) y se incubaron a 37 °C durante 48h con un 5% de CO₂. La presencia de un halo traslucido alrededor de la colonia se tomó como indicador de actividad hemolítica positiva. Se utilizaron la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 como control positivo y la cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 como control negativo. Los resultados se expresaron mediante el índice Pz y los aislamientos se clasificaron como no productores (Pz=1), productores moderados ($0.64 \leq 0.69$) y altos productores $Pz \leq 0.63$ ⁽⁹⁸⁾. Se realizaron dos réplicas por aislamiento y el índice de actividad correspondió a la media aritmética de ambos valores.

III.5 Procesamiento y análisis de los resultados

Partiendo de la planilla de los resultados de laboratorio se elaboró una base de datos usando los sistemas Microsoft Office Access 2007, esto permitió realizar el análisis (descriptivo y analítico) de las variables. Se halló el grado de concordancia de los perfiles de sensibilidad entre los dos métodos calculando el índice de Kappa usando el programa Epidat con un nivel de confianza del 95%. Todos los resultados (descriptivos y analíticos) se expresaron mediante tablas y gráficos usando el programa Microsoft Office Excel 2003. En cada variable se analizó la posible causa de los resultados y estos se compararon con los encontrados en la literatura de nacional e internacional.

III.6 Consideraciones éticas

En el estudio no se utilizó el consentimiento informado de los pacientes, ya que se trabajó con aislados micóticos obtenidos de pacientes con otomicosis en el Hospital Clínico Quirúrgico " Manuel Fajardo " conservados en el Laboratorio

Nacional de Referencia, pero se tuvieron en cuenta los principios de la bioética de beneficencia y justicia manteniendo la discreción requerida con la identidad de cada persona.

El protocolo de la investigación fue evaluado por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética de las Investigaciones del IPK, según lo normado en el Departamento Bacteriología-Micología del Instituto de Medicina Tropical "*Pedro Kouri*".

El proyecto se realizó como parte del trabajo para la obtención del título de Máster en Bacteriología-Micología del Dr. Javier Martínez Alfonso, especialista de primer grado en Medicina General Integral y de primer grado en Microbiología.

Debido al riesgo individual que enfrentó el trabajador del laboratorio, el peligro que representó para la comunidad y el medio ambiente, la naturaleza propia de los agentes en cuanto a su patogenicidad y virulencia reconocidas, se tuvieron en cuenta las prácticas, procedimientos y equipos de seguridad que corresponden al nivel de seguridad biológica II (NSB-2) y se aplicaron las medidas que permitieron garantizar la seguridad del investigador y la integridad de la comunidad y el ambiente.

El trabajo con los microorganismos involucrados en el estudio constituyó un riesgo individual moderado y comunitario limitado.

El LNR es un laboratorio convencional que satisface los requisitos mínimos indispensables para el trabajo con gérmenes patógenos, diseñado para el trabajo con agentes de los grupos de riesgo I y II. Cuenta con los equipos y materiales correspondientes para el trabajo con hongos patógenos.

IV- Resultados y discusión

La necesidad de contar con pruebas de susceptibilidad antifúngica reproducibles se ha incrementado por el aumento del número de infecciones por hongos, la expansión del uso de nuevos antimicóticos y de aquellos ya establecidos y el reconocimiento de la resistencia antifúngica como un importante problema de salud ⁽⁹⁹⁾. Los métodos de referencia M27-A del CLSI y el E.Def 7.1 del EUCAST permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a las levaduras. Ambos estándares son fiables, reproducibles y muy útiles para la vigilancia epidemiológica. Gracias a ellos se puede conocer el perfil de sensibilidad de las distintas especies y, de esa forma, elegir el tratamiento inicial más adecuado. Sin embargo, la realización de estas técnicas es onerosa y muy laboriosa, por lo que su implementación se ve limitada en los laboratorios clínicos ⁽⁷¹⁾.

A la par de esto, las técnicas comerciales para realizar estudios de susceptibilidad se han implementado. Estos métodos son muy útiles para conocer la resistencia de las levaduras a los azoles o a las equinocandinas y pueden emplearse para instaurar el tratamiento antifúngico más adecuado en cada paciente. Los expertos aconsejan utilizar técnicas con validación clínica y confirmar las resistencias mediante los procedimientos de referencia en caso de detectar cepas con resistencia *in vitro* ⁽⁸¹⁾.

En el presente estudio se parte de un universo conformado por 19 aislados de *Candida* procedentes de pacientes con otomicosis con pruebas de susceptibilidad antifúngicas realizadas por el método comercial ATB FUNGUS 3. Todos estos aislados fueron susceptibles a AMB, 5FC, ITZ, FCZ y VRZ. El estudio de susceptibilidad antifúngica se realizó por segunda ocasión, esta vez utilizando el método de referencia indicado por el CLSI, plasmado en el documento M27 A-2, y se compararon ambos resultados calculando el grado de concordancia entre ambos métodos utilizando el índice de Kappa.

En los estudios que tratan de evaluar la validez de una medida se comparan sus resultados con los obtenidos mediante una prueba de referencia que se sabe válida y fiable para la medición del fenómeno de interés ⁽¹⁰⁰⁾. La

concordancia entre variables es de sumo interés en la práctica clínica habitual y las técnicas de análisis dependen del tipo de variable a estudiar. El índice estadístico más utilizado para la comparación de variables cualitativas es el índice de Kappa ^(100, 101).

IV.1 Estudio de susceptibilidad

Los 12 aislados de *C. parapsilosis* del presente estudio, hubo 100% de susceptibilidad frente a 5FC, AMB, FCZ y KTZ; dos fueron resistentes al ITZ (16,6%).

Uno de los tres aislados de *C. tropicalis* fue sensible a todos los antifúngicos, dos fueron resistente al ITZ y a FCZ y un aislado resistente a todos los azoles probados en el estudio (75%).

Los dos aislados *C. famata* (100%) y uno de los dos de *C. albicans* fueron susceptibles a todos los antifúngicos (50%). Un aislado de *C. albicans* fue resistente a KTZ (50%).

Las CMI obtenidas para 5FC fluctuaron entre 0,1 y 4 µg/mL, para AMB fueron entre 0,5 y 0.03 µg/mL, FCZ presentó rangos de CMI para *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. albicans* entre 4 y 0,03 µg/mL, para *C. famata* entre 1 y 2 µg/mL, el rango de CMI obtenido para ITZ estuvo entre 0,5 y 0,03 µg/mL y KTZ mostró un rango entre 8 y 0,03 µg/mL.

IV.1.1 Estudio de susceptibilidad frente a Fluocitosina

En cuanto a los resultados de susceptibilidad por especies, *C. parapsilosis* para 5FC presentó un rango de CMI entre 0,12 y 4 µg/mL, el 100% de estos aislados fue sensible para este antifúngico (tabla IV.1), siendo este resultado similar al informado por varios autores ^(15, 102-104). Estos resultados difieren con un estudio de vigilancia de la resistencia en EUA del 2003 ⁽¹⁰⁵⁾ quienes informan un 2% de resistencia y difiere aún más con el informe de otro estudio realizado en el año 1975 donde se describe una resistencia del 23% de los aislados de este hongo al antifúngico en cuestión ⁽¹⁰⁶⁾.

La monoterapia con 5FC está contraindicada ya que incrementa la posibilidad de la aparición de la resistencia principalmente durante la administración prolongada tal como ocurre durante el tratamiento de la endocarditis (57, 79).

Los aislados de *C. parapsilosis* utilizados en el presente estudio no han estado en contacto con 5FC, esto quizás explicaría la falta de resistencia de esta especie al antifúngico en cuestión.

En Cuba no existen trabajos que evalúen la resistencia de *C. parapsilosis* a 5FC por el método de referencia.

Tabla IV.1 Susceptibilidad y valores de concentraciones mínimas inhibitorias en los aislados de *Candida* a fluocitosina. IPK 2018

Especies	CMI (µg/mL)											
	R		I		S							
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<i>Candida parapsilosis</i> n=12	-	-	-	-	8,4%	-	-	25%	25%	41,6%	-	-
<i>Candida albicans</i> n=2	-	-	-	-	-	-	-	-	100%	-	-	-
<i>Candida famata</i> n=2	-	-	-	-	50%	-	-	-	-	50%	-	-
<i>Candida tropicalis</i> n=3	-	-	-	-	-	-	-	-	75%	25%	-	-

Leyenda: S- Sensible I- Intermedio R- Resistente

Los dos aislados de *C. albicans* fueron sensibles, un trabajo realizado en Cuba en 1997 con 50 aislados de muestras diversas y que utilizó los mismos criterios de resistencia y sensibilidad que el presente estudio (107) aplicó dos métodos de lectura diferentes: en la lectura visual, el 90% de las cepas fueron sensibles, el 2% presentó sensibilidad intermedia y el 8% fue resistente y en la lectura automatizada el 92% de esas cepas fueron sensibles, el 2% presentó sensibilidad intermedia y el 6% resistente. Zhang *et al* en 2014 en China (15), en 625 aislados de *C. albicans* de muestras clínicas diversas encontró solo 4,4% de resistencia de esta especie a 5FC.

El resultado del trabajo cubano confirmó la alta sensibilidad que presenta *C. albicans* a este antifúngico en Cuba, sin embargo, el número de aislados en el presente estudio no permite arribar a estas conclusiones.

Los dos aislados de *C. famata* fueron sensibles, Pfaller *et al* en EUA ⁽¹⁰⁸⁾ en 2014, en cuatro aislados de pacientes con candidemia informan similar resultado. Este mismo autor, en un estudio del 2003 ⁽¹⁰⁹⁾, de 10 aislados estudiados, informa uno resistente. Ozcelik *et al* en Turquía ⁽¹¹⁰⁾ en aislados de pacientes con cáncer no informa resistencia de este hongo a 5FC.

Tres aislados de *C. tropicalis* fueron susceptibles a 5FC (100%), resultado similar a lo informado por Pfaller ⁽¹⁰⁸⁾ y Ozcelik *et al* ⁽¹¹⁰⁾ pero que difiere a lo informado por St-Germain *et al* ⁽¹¹¹⁾ en Canadá, quienes en 21 aislados de pacientes con candidemia encontraron 9,5% de resistencia.

La resistencia a 5FC está bien determinada en varias especies de *Candida* e incluye mutaciones en los genes *FCY2*, *FCY1* y *FUR1*, estos genes codifican para la citosina permeasa, citosina desaminasa y la uracilfosforiltransferasa respectivamente. Varios patrones de susceptibilidad disminuida han sido identificados dependiendo de la mutación presente. En general, mutaciones en el gen *FCY2* dan como resultado, en los estudios de susceptibilidad, CMI > 0,5 µg/mL pero < de 8 µg/mL y las mutaciones en los genes *FCY1* y *FUR1* dan como resultado CMI ≥ de 32 µg/mL por lo que es poco probable que las cepas que presenten CMI ≤ 0,5 µg/mL posean alguna de las mutaciones descritas anteriormente ⁽¹¹²⁾. Los genes que codifican estas enzimas contribuyen a la aparición de resistencia cruzada con FCZ ⁽⁷⁹⁾.

En el presente estudio, un aislado de *C. parapsilosis* (8,4%) y uno de *C. famata* (50%) presentan una CMI de 4 µg/mL, pudiendo estar presente en estos aislados la mutación descrita para el gen *FCY2*, resultado que debe ser confirmado por métodos moleculares.

En la literatura consultada aparecen pocos estudios que hagan la comparación de resultados obtenidos entre el método de referencia y el método comercial ATB FUNGUS 3, Zhang *et al* ⁽¹¹³⁾ en China compara los resultados obtenidos con el ATB FUNGUS 3 mediante lectura automatizada y lectura visual con los

obtenidos con el método de referencia con un resultado similar al del presente estudio.

De manera general, los resultados del estudio de susceptibilidad para 5FC por el método comercial y los resultados del estudio por el método de referencia para los 19 aislados del presente estudio presentaron un valor de $k= 1$ con un valor de $p= 0,00$, valor que de acuerdo a la escala de concordancia, muestra una concordancia total (tabla IV.2).

Tabla IV.2 Resultados del estudio de concordancia entre el método de estudio de susceptibilidad comercial ATB FUNGUS 3 y el método de referencia del CLSI en los aislados de *Candida* a fluocitosina. IPK 2018

Especies	Concordancia (k)	Valor de p
<i>C. parapsilosis</i>	1	0,00
<i>C. famata</i>	1	0,04
<i>C. albicans</i>	1	0,04
<i>C. tropicalis</i>	1	0,01

IV.1.2 Estudio de susceptibilidad frente a Anfotericina B

En el estudio de susceptibilidad de los aislados de *C. parapsilosis* frente a AMB, el 100% fue susceptible (tabla IV.3). Fernández *et al* ⁽¹¹⁴⁾ en Cuba, en 12 aislados orofaríngeos de pacientes VIH/Sida no informa resistencia. Este resultado es similar al informado por Benjelloul en Argelia ⁽¹¹⁵⁾ y Zhang *et al* en China ⁽¹⁵⁾ en muestras clínicas diversas. En la literatura consultada múltiples estudios presentaron igual resultado ^(102, 111, 116-118). Ataidés *et al* en Brasil ⁽¹¹⁹⁾ al utilizar el método Etest, de 78 aislados de *C. parapsilosis* informa resistencia solo en uno y Lochart *et al* en EUA ⁽¹²⁰⁾, con igual metodología, de 778 aislados encontró uno resistente a este antifúngico.

En la vigilancia de la resistencia antifúngica en EUA del año 2003 ⁽¹⁰⁵⁾ se informó una resistencia de 2%. Se han reportado casos de resistencia de *C. parapsilosis in vivo* en pacientes tratados con AMB ^(121, 122).

Los dos aislados de *C. albicans* fueron susceptibles. Fernández *et al* en Cuba⁽¹²³⁾ en 1998, informa que de 39 estudiados solo uno fue resistente, este mismo autor en un estudio de 2007 en 12 aislados no detecta resistencia. Un estudio en Nepal ⁽¹²⁴⁾ informa que el 97,2% de los aislados de *C. albicans* de pacientes con candidemia fue sensible a AMB. En el estudio de vigilancia de 2003 en EUA ⁽¹⁰⁵⁾, en 773 aislados estudiados de este hongo no se halla resistencia a AMB. Igual resultado publica un estudio de vigilancia en Brasil⁽¹²⁵⁾.

Tabla IV.3 Susceptibilidad y valores de concentraciones mínimas inhibitorias en los aislados de *Candida* a anfotericina B. IPK 2018

Especies	CMI (µg/mL)									
	R				S					
	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<i>Candida parapsilosis</i> n=12	-	-	-	-	-	100%	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> n=2	-	-	-	-	-	100%	-	-	-	-
<i>Candida famata</i> n=2	-	-	-	-	-	100%	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> n=3	-	-	-	-	-	100%	-	-	-	-

Leyenda: S- Sensible R- Resistente

Este resultado difiere con el informe publicado por Sharifynia *et al* ⁽¹²⁶⁾ en Irán, en este estudio realizado en 121 muestras respiratorias el 62,1% de los aislados fueron resistentes y los autores no esclarecen que mecanismo de resistencia pudiera estar involucrado en la disminución de la susceptibilidad de estos al antifúngico en estudio.

Los dos aislados de *C. famata* fueron susceptibles. Ozcelik *et al* en Turquía ⁽¹¹⁰⁾ en igual número de aislados y Pfaller *et al* en EUA ⁽¹⁰⁹⁾ en diez informan igual resultado. Yan *et al* ⁽¹¹⁸⁾ en EUA informan de un aislado resistente a este antifúngico. Beyda *et al* en Singapur hace una revisión de ocho artículos que describen la susceptibilidad de este hongo en 49 aislados obtenidos de

muestras clínicas diversas y no hallan resistencia, además hacen la recomendación de retirar el catéter endovenoso e imponer tratamiento con anfotericina B en aquellos casos en los que se sospeche fungemia por esta especie ⁽¹²⁷⁾.

El 100% de los aislados de *C. tropicalis* fue sensible. Fernández *et al* en Cuba ⁽¹¹⁴⁾ en 2007 en 10 aislados provenientes de pacientes VIH/Sida no informan resistencia a este antifúngico. Estos mismos autores, en un trabajo anterior realizado en 1998, usando una metodología diferente, en tres aislados de *C. tropicalis* tampoco encontraron resistencia ⁽¹²³⁾. Coinciden estos resultados también con el informe publicado por Yesudhasan *et al* en la India ⁽¹²⁸⁾ quienes estudia 61 aislados de este hongo provenientes de muestras clínicas diversas y no detecta resistencia y con Yang *et al* en EUA ⁽¹¹⁸⁾ que de 163 aislados estudiados detectaron resistencia solo en uno y difieren con lo que informa un estudio realizado en Brasil en 2016 ⁽¹²⁹⁾ donde se investigaron 63 aislados de *C. tropicalis* provenientes de ambientes costeros y 14 (22,6%) fueron resistentes. Baghdadi *et al* en Irán ⁽¹³⁰⁾ también informan resistencia (16,7%) en diez aislados.

El número limitado de aislados de *C. tropicalis* en el presente estudio no permite llegar a conclusiones.

El desarrollo de resistencia adquirida a AMB en *Candida* es infrecuente sin embargo, algunos autores la han documentado. Un gran número de fallos terapéuticos con el uso de este antifúngico han sido asociados a *C. lusitaniae*. La principal alteración envuelta en la resistencia a los polienos se encuentra en las enzimas que participan en la biosíntesis del ergosterol. Mutaciones en los genes *ERG2* y *ERG3* que codifican para la enzima C-8 esterol isomerasa y la enzima Δ desaturasa producen modificaciones cuantitativas y cualitativas en el contenido de esterol de la membrana influenciando en la cantidad de ergosterol o en su disponibilidad para la acción de este antifúngico ⁽¹³¹⁾.

Se compararon los resultados de susceptibilidad frente al AMB del presente estudio con los obtenidos por el método comercial y se observó la concordancia máxima posible para todas las especies (tabla IV.4). A Igual

conclusión arriban Zhang *et al* en China ⁽¹¹³⁾ cuando comparan los resultados de los dos métodos.

Tabla IV.4 Resultados del estudio de concordancia entre el método de estudio de susceptibilidad comercial ATB FUNGUS 3 y el método de referencia del CLSI en los aislados de *Candida* a anfotericina B. IPK 2018

Especies	Concordancia (k)	Valor de p
<i>C. parapsilosis</i>	1	0,00
<i>C. famata</i>	1	0,04
<i>C. albicans</i>	1	0,04
<i>C. tropicalis</i>	1	0,01

IV.1.3 Estudio de susceptibilidad frente a fluconazol

En el estudio de susceptibilidad frente a FCZ se tomaron en cuenta los puntos de corte específicos para las especies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. albicans*. Para *C. famata* no existen puntos de corte específicos.

De los 12 aislados de *C. parapsilosis*, dos fueron resistentes (16,6%), cuatro (33,3%) sensibles dependientes de la dosis y seis sensibles (66,7%) (Tabla IV. 5) Fernández *et al* en Cuba en 2007 ⁽¹¹⁴⁾ no informan resistencia, este grupo de autores no utiliza los puntos de corte usados en el presente estudio. Tosun *et al* en Turquía ⁽¹³²⁾ informan que de 36 aislados de *C. parapsilosis* 97,2% fueron sensibles, sensibles dependientes de la dosis 2,8% y no informan resistencia. Baghdadi *et al* en Irán ⁽¹³⁰⁾ tampoco informan resistencia, en este estudio 87,5% de los aislados fueron sensibles y el 12,5% presentó sensibilidad intermedia.

La resistencia de *C. parapsilosis* a FCZ es infrecuente pero se han descrito casos en que la resistencia a este antifúngico se ha desarrollado después de una terapia prolongada, estas cepas pueden desarrollar resistencia a otros azoles y a las equinocandinas ⁽¹³³⁾. Un estudio en Túnes evalúa a FCZ frente a 172 aislados y detecta resistencia en el 5,4%, explican este hecho como una combinación de mecanismos moleculares que incluye la sobreexpresión del

gen *ERG11* y de otros genes que codifican para las bombas de eflujo (*CDR1*, *MDR1* y *MRR1*) ⁽¹⁰²⁾.

De los tres aislados de *C. tropicalis*, dos fueron resistente (CMI= 64µg/mL) y uno sensible. Estos aislados, en el estudio de susceptibilidad realizado con el método comercial ATB FUNGUS 3 fueron sensibles. Fernández *et al* en Cuba ⁽¹¹⁴⁾ a pesar de no usar los puntos de corte utilizados en el presente estudio, en diez aislados provenientes de pacientes VIH/Sida no encuentran resistencia, al trasladar los valores de CMI obtenidos en dicho estudio a los valores de corte especie específicos que brinda el CLSI se mantiene el mismo resultado.

Tabla IV.5 Susceptibilidad y valores de concentraciones mínimas inhibitorias en los aislados de *Candida* a fluconazol (Puntos de corte específicos del CLSI) para *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*. IPK 2018

Especies	CMI (µg/mL)											
	R				SDD	S						
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<i>Candida parapsilosis</i> n=12	-	16,6%	-	-	33,3%	8,3%	33,%	8,3%	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> n=3	66,6%	-	-	-	-	33,3	-	-	-	-	-	-

Leyenda: S- Sensible SDD- Sensible dependiente de la dosis R- Resistente

Un estudio en Irán ⁽¹³⁰⁾, en 12 aislados informa tres sensibles (25%), cuatro dependiente de la dosis (33,3%) y cinco resistentes (41,6%).

En comparación con otras especies de *Candida*, es poco lo que se conoce sobre la relación entre *C. tropicalis* y los mecanismos de resistencia a los azoles. Un estudio de 52 aislados clínicos en China demostró sobreexpresión del gen *ERG11* en aquellos que fueron resistentes a FCZ siendo esta sobreexpresión aún mayor en aquellos aislados que fueron resistentes también a ITZ y al VRC. Estos resultados también fueron reproducidos por un estudio en Corea que caracterizó nueve cepas de *C. tropicalis* resistentes a FCZ. La caracterización molecular de la resistencia de los aislados clínicos de

C. tropicalis a los azoles ha revelado alteraciones en las vías de biosíntesis del ergosterol. Un aislado resistente en Túnez presentó mutaciones en el gen *ERG3* y *ERG11*, mutaciones implicadas en la disminución de la biosíntesis del ergosterol ⁽¹³⁴⁾.

El número de aislados de *C. tropicalis* en el presente estudio no permite obtener conclusiones sobre el comportamiento de la resistencia de este hongo a FCZ en Cuba pero su caracterización molecular ayudaría a comprender los posibles mecanismo envueltos y compararlos con los resultados de otras investigaciones.

Los dos aislados de *C. albicans* fueron sensibles dependientes de la dosis (tabla IV.6). En Cuba, Fernández *et al* en 2007 ⁽¹¹⁴⁾, de 131 aislados estudiados informan sensibles 95,4%, sensibles dependiente de la dosis 3% y resistentes 1,5%. Este informe no está realizado tomando en cuenta los puntos de corte especie específicos que brinda el CLSI en la actualidad ⁽⁸¹⁾.

Tabla IV.6 Susceptibilidad y valores de concentraciones mínimas inhibitorias en los aislados de *Candida* a fluconazol (Puntos de corte específicos del CLSI para *Candida albicans*). IPK 2018

Especies	CMI (µg/mL)											
	R				SDD		S					
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<i>Candida albicans</i> n=2	-	-	-	-	50%	50%	-	-	-	-	-	-

Leyenda: S- Sensible SDD- Sensible dependiente de la dosis R- Resistente

Si se trasladaran esos resultados a los valores de los puntos de corte especie específicos de FCZ para *C. albicans*, los niveles de resistencia serían mayores al igual que los niveles de susceptibilidad dependiente de la dosis. Zhang *et al* en China ⁽¹⁵⁾, en 625 aislados de diferentes muestras, tomando en cuenta estos puntos de corte, encuentran 4,3% de resistencia pero no informan los aislados sensibles dependientes de la dosis. En este estudio, dentro de los aislados resistentes, cuatro presentaron resistencia cruzada con VRC. Para estos

autores, la resistencia a los azoles en esta área geográfica y en Corea está correlacionada con el incremento del uso del FCZ y opina que la continua exposición impacta en la selección de las especies resistentes de *Candida*.

Yenisehirli *et al* en Turquía ⁽¹³⁵⁾ informan resistencia de *C. albicans* a FCZ de 34% en 201 aislados de muestras clínicas diversas, estos autores encuentra diferencias entre su estudio y otros realizados con anterioridad en la misma área geográfica que muestran tasas de resistencia mucho menores y explica este hecho proponiendo varias explicaciones: las variaciones en las tasas de resistencia pueden ser el resultado de diferencias entre las poblaciones estudiadas, exposición previa a los azoles y diferentes valores de puntos de corte. Este autor refiere que las tasas de resistencia en aislados de *C. albicans*, con los nuevos puntos de corte que brinda el CLSI, son más altas que las informadas con anterioridad.

La resistencia a los azoles ha sido estudiada muy ampliamente en *C. albicans*. Uno de los mecanismos identificados son las mutaciones en el gen *ERG11*, Otro mecanismo involucrado es la sobreexpresión de este mismo gen debido a la activación de mutaciones que modifican el regulador *transcripcional-cluster* de zinc Upc2p, este es un regulador de la expresión de *ERG11*, las mutaciones y la sobreexpresión de este gen producen un incremento de la producción de ergosterol y trae como consecuencia una disminución de la susceptibilidad a FCZ ⁽¹³⁴⁾.

Uno de los aislados de *C. famata* fue sensible y el otro sensible dependiente de la dosis (tabla IV.7). Ozcelik en Turquía ⁽¹¹⁰⁾ en dos aislados de pacientes con cáncer y Yang *et al* EUA ⁽¹¹⁸⁾ en aislados de muestras clínicas diversas no informan resistencia, sin embargo, Pfaller *et al* en EUA en diez aislados provenientes de pacientes con candidemia informan resistencia en cuatro ⁽¹⁰⁹⁾. Beyda *et al* en Singapur ⁽¹²⁷⁾ en una revisión de artículos informan reducción de la susceptibilidad de esta especie a los azoles y a las equinocandinas, sobre todo en aquellos casos en los que se existe el antecedente de exposición a estos antifúngicos.

Tabla: VI.7 Susceptibilidad y valores de concentraciones mínimas inhibitorias en los aislados de *Candida famata* a fluconazol. IPK 2018.

Especies	CMI (µg/mL)											
	R				SDD	S						
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<i>Candida famata</i> n=2	-	-	-	-	-	50%	50%	-	-	-	-	-

Leyenda: S- Sensible SDD- Sensible dependiente de la dosis R- Resistente

Al comparar los resultados obtenidos en el estudio de susceptibilidad por el método de referencia con los obtenidos para FCZ (tabla IV.8) podemos observar que para las especies *C. famata* y *C. albicans* se obtuvo la mayor concordancia posible, para *C. parapsilosis* la concordancia fue buena y para *C. tropicalis* la concordancia fue pobre.

Tabla IV.8 Resultados del estudio de concordancia entre el método de susceptibilidad comercial ATB FUNGUS 3 y el método de referencia del CLSI en los aislados de *Candida* a Fluconazol. IPK 2018

Especies	Concordancia (k)	Valor de p
<i>C. parapsilosis</i>	0,66	0,001
<i>C. famata</i>	1	0,04
<i>C. albicans</i>	1	0,04
<i>C. tropicalis</i>	0	1

Zhang *et al* ⁽¹¹³⁾ informa en su estudio buena concordancia entre los dos métodos para el estudio de susceptibilidad de los aislados de *Candida* frente a FCZ cuando se hace lectura visual del ATB FUNGUS 3, no así cuando la lectura se hace de manera automatizada para las especies *C. tropicalis* y *C. albicans*. A igual conclusión llega Torres *et al* en España ⁽¹³⁶⁾ al comparar el ATB FUNGUS 2 con el método de referencia. Debido al número limitado de muestras incluidas en el presente estudio no es posible llegar a conclusiones.

IV.1.4 Estudio de susceptibilidad frente a Itraconazol

Frente a ITZ, 8,3% de *C. parapsilosis* fue sensible y el 91,6% fue sensible dependiente de la dosis (tabla IV.9). Jerez *et al* en Cuba ⁽¹³⁷⁾ no informa resistencia en dos aislados provenientes de la cavidad oral de pacientes VIH/Sida

Tabla: IV.9 Susceptibilidad y valores de concentraciones mínimas inhibitorias en los aislados de *Candida* a Itraconazol. IPK 2018

Especies	CMI (µg/mL)									
	R					SDD		S		
	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<i>Candida parapsilosis</i> n=12	-	-	-	-	-	50%	41,6%	8,3	-	-
<i>Candida albicans</i> n=2	-	-	-	-	-	50%	50%	-	-	-
<i>Candida famata</i> n=2	-	-	-	-	-	-	100%	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> n=3	75%	-	-	-	-	-	25%	-	-	-

Leyenda: S- Sensible SDD- Sensible dependiente de la dosis R- Resistente

Zhang *et al* en China ⁽¹⁵⁾ tampoco informa resistencia en 12 aislados de muestras diversas. Baghdadi *et al* en Irán ⁽¹³⁰⁾ informa en 16 aislados 37,5% sensible y 62% sensible dependiente de la dosis. Estos resultados difieren con el estudio realizado por Ostrosky *et al* en EUA ⁽¹⁰⁵⁾, estos autores estudiaron 391 aislados obtenidos de pacientes con candidemia y detectaron resistencia en el 4% de estos. También difiere con Arias *et al* en España ⁽¹³⁸⁾, quienes informan 1,5% de resistencia. Los mecanismos de resistencia a los azoles fueron antes explicados durante la discusión de los resultados frente a FCZ.

Uno de los dos aislados de *C. albicans* fue sensible y el otro fue sensible dependiente de la dosis (tabla 10). Jerez *et al* en Cuba ⁽¹³⁷⁾ al estudiar 132 aislados provenientes de la cavidad oral de pacientes VIH/Sida informa 94% sensible, 3,7% sensibles dependiente de la dosis y 2,2% de resistencia. Zhang *et al* en China⁽¹⁵⁾, de 625 aislados informa solo 1,3% de resistencia, estos

resultados difieren con lo informado por Yenisehirli *et al* en Turquía ⁽¹³⁵⁾, este autor informa 21% de resistencia en 221 aislados. En este estudio se encuentra también una resistencia alta de *C. albicans* a FCZ (34%). Existen estudios que han documentado que la disminución de la susceptibilidad a FCZ está asociada a una disminución de la susceptibilidad a otros azoles indicando existencia de resistencia cruzada en *Candida* para este grupo de antifúngicos ⁽¹³⁵⁾.

En el presente estudio los dos aislados de *C. albicans* presentaron susceptibilidad dependiente de la dosis a FCZ y a ITZ y este hecho pudiera indicar existencia de resistencia cruzada a estos dos antifúngicos. Esta evidencia debe ser probada con estudios de biología molecular

El estudio de susceptibilidad para *C. famata* se comportó de la siguiente manera, los dos aislados fueron susceptibles dependiente de la dosis. Jerez *et al* en Cuba ⁽¹³⁷⁾ informa de un aislado sensible. Pfaller *et al* en EUA ⁽¹⁰⁹⁾ realiza el estudio en diez aislados y uno de ellos fue resistente. En la literatura consultada son pocas las investigaciones donde se hacen estudios de susceptibilidad a *C. famata* frente a ITZ.

De los tres aislados de *C. tropicalis*, dos fueron resistente (CMI>16 µg/mL) y el otro sensible dependiente de la dosis (CMI> 0,25 µg/mL). Este resultado difiere con el estudio de Jerez *et al* en Cuba ⁽¹³⁷⁾ quien informa dos aislados sensibles. Baghdadi *et al* en Irán ⁽¹³⁰⁾ de 12 aislados que estudia informa cuatro (33,3%) sensibles y ocho (66,6%) resistentes. Zomorodian *et al* en Irán ⁽¹³⁾ informa una resistencia aún mayor, en 17 aislados detecta 11 resistentes (70,5%), uno sensible dependiente de la dosis (6%) y cinco sensibles (29,4%).

Llama la atención que los aislados de *C. tropicalis* que fueron resistentes a ITZ también fueron resistentes a FCZ. Esto pudiera guardar relación con la presencia de resistencia cruzada a los azoles, fenómeno comentado cuando se evaluó la susceptibilidad frente a FCZ.

Los resultados del estudio de susceptibilidad frente al ITZ usando el método de referencia y los obtenidos con el método comercial, para las especies *C. parapsilosis*, *C. famata* y *C. albicans* (tabla IV.10) presentaron una

concordancia máxima no así para *C. tropicalis* para la cual se obtuvo una concordancia débil.

Tabla IV.10 Resultados del estudio de concordancia entre el método de susceptibilidad comercial ATB FUNGUS 3 y el método de referencia de referencia del CLSI en los aislados de *Candida* a Itraconazol. IPK 2018

Especies	Concordancia (k)	Valor de p
<i>C. parapsilosis</i>	1	0,00
<i>C. famata</i>	1	0,04
<i>C. albicans</i>	1	0,04
<i>C. tropicalis</i>	0,33	0,27

Este resultado difiere con el informe de Zhang *et al* en China ⁽¹¹³⁾ quien encuentra buena concordancia entre los dos métodos cuando se hace lectura visual del ATB FUNGUS 3, no así con la lectura automatizada. Algunos autores discrepan con esta opinión y refieren que la lectura por espectrofotometría permite una mejor valoración de la CMI para los azoles ya que el fenómeno de crecimiento residual observado para estos antifúngicos no interfiere con este método de lectura ⁽⁹⁴⁾.

A pesar de la discordancia entre el resultado obtenido para el ITZ por el método comercial y el obtenido por el método de referencia para *C. tropicalis* esta no es estadísticamente significativa ($p=0,27$) debido quizás al número limitado de aislados utilizados en el estudio.

De manera general, para todos los aislados del presente estudio, existió muy buena concordancia para 5FC y para AMB ($k=1$), al igual que para ITZ ($k=0,89$) y buena concordancia para FCZ ($k=0,78$).

IV.1.4 Estudio de susceptibilidad frente a Ketoconazol

Este antifúngico no se encuentra en el panel del ATB FUNGUS 3 y forma parte del Formulario Nacional de Medicamentos de Cuba encontrándose disponible para el tratamiento de la otomicosis.

Frente a KTZ todos los aislados de *C. parapsilosis* fueron sensibles con una CMI que fluctuó entre 0,03 y 0,25 µg/mL (tabla IV.11). Este resultado es similar con lo informado por Jerez *et al* en Cuba ⁽¹³⁷⁾ en dos aislados provenientes de pacientes VIH/Sida y con Zomorodian *et al* en Irán ⁽¹³⁾ en 27 aislados de muestras clínicas diversas. En la literatura consultada no se encontraron estudios que informaran resistencia de *C. parapsilosis* a KTZ.

Tabla IV.11 Susceptibilidad y valores de concentraciones mínimas inhibitorias en los aislados de *Candida* a Ketoconazol. IPK 2018

Especies	CMI (µg/mL)									
	R			S						
	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<i>Candida parapsilosis</i> n=12	-	-	-	-	-	-	50%	-	33,3%	16,6%
<i>Candida albicans</i> n=2	-	50%	-	-	-	-	-	-	50%	-
<i>Candida famata</i> n=2	-	-	-	-	-	-	-	-	50%	50%
<i>Candida tropicalis</i> n=3	-	-	50%	25%	-	-	25%	-	-	-

Leyenda: S- Sensible R- Resistente

Uno de los aislados de *C. albicans* fue resistente y el otro sensible. Jerez *et al* en Cuba ⁽¹³⁷⁾, en 122 aislados no encuentra resistencia al igual que Badiee *et al* en Irán⁽¹³⁹⁾ en 117 aislados. Zomorodian *et al* también en Irán ⁽¹³⁾ en 114 aislados informa resistencia en dos (1,5%). Un estudio realizado en Nigeria ⁽¹⁴⁰⁾ en 124 aislados provenientes de pacientes con infección genitourinaria mostró una tasa de resistencia de 37,1% y los autores no ofrecen una explicación sobre los mecanismos de resistencias que pudieran estar involucrados.

Los dos aislados de *C. famata* fueron sensibles. Igual resultado informa Ozcelik *et al* en Turquía ⁽¹¹⁰⁾. En Cuba, Jerez *et al* ⁽¹³⁷⁾ informa resistencia en un aislado. En la literatura consultada se encontraron pocos trabajos que estudiaran la susceptibilidad de este hongo a KTZ. Esto quizás se deba a que *C. famata* es un hongo que se ha asociado a infecciones profundas e

infecciones asociadas al uso de catéteres ⁽¹²⁷⁾ y el antifúngico en cuestión ha visto limitado su uso a tratamientos tópicos debido a su alta toxicidad ⁽⁹⁴⁾.

Un aislado de *C. tropicalis* fue resistente y dos sensibles. Jerez *et al* ⁽¹³⁷⁾ en dos aislados no informa resistencia. Ozcelik *et al* en Turquía ⁽¹¹⁰⁾ en nueve aislados tampoco informa resistencia al igual que Goulart *et al* en Brasil ⁽¹⁴¹⁾ en diez aislados provenientes de pacientes con infección vulvovaginal. Múltiples son los trabajos que muestran alta susceptibilidad de *C. tropicalis* a KTZ sin embargo, existe el reporte de un brote de fungemia en 1999 por este hongo durante profilaxis con KTZ en tres niños y tres adultos en el Instituto Nacional del Cáncer en la ciudad de Bratislava ⁽¹⁴²⁾.

KTZ fue el primer antifúngico de amplio espectro disponible para el uso por vía oral para el tratamiento de las micosis profundas y superficiales. Las evidencias de hepatotoxicidad que surgieron en el primer año de su aprobación además de serios efectos colaterales que incluían alteraciones endocrinas, interacciones medicamentosas severas y muertes hicieron que se hiciera una revisión de este antifúngico en 2011. Debido a esto, KTZ oral fue retirado del mercado en Europa y Australia en 2013 y EUA impuso requerimientos estrictos para su prescripción. En la actualidad solo está indicado para las micosis endémicas cuando no existe otra alternativa. Sin embargo, su uso tópico es efectivo, seguro y ampliamente prescrito para las micosis superficiales siendo la primera línea del tratamiento de la pitiriasis versicolor ⁽¹⁴³⁾.

IV.1.6 Patrones de resistencia obtenidos en el estudio de susceptibilidad

En el presente estudio fueron resistentes a un antifúngico dos aislados de *C. parapsilosis* y un aislado de *C. albicans*; a dos antifúngicos un aislado de *C. tropicalis* y a tres antifúngicos otro aislado de *C. tropicalis*, pudiendo estar presente en esta última especie el fenómeno de resistencia cruzada a los azoles, hecho que debe probarse por métodos moleculares (figura 1).

Existen múltiples investigaciones que abordan la resistencia antifúngica en *Candida* pero la mayoría a partir de las implicaciones que tiene este fenómeno en el tratamiento y el pronóstico de las micosis invasivas ^(18, 144, 145). Yesudhasan *et al* en la India ⁽¹²⁸⁾ en 61 aislados de este hongo provenientes de

muestras diversas encuentra alta resistencia a FLZ, ITZ y KTZ. La resistencia a los azoles en esta especie ha sido bien documentada, especialmente al fluconazol. Varios estudios han demostrado un incremento en la prevalencia y en la incidencia de la resistencia antifúngica en *C. tropicalis* así como un incremento en la morbilidad y mortalidad causadas por este patógeno en pacientes hospitalizados ⁽¹²⁸⁾.

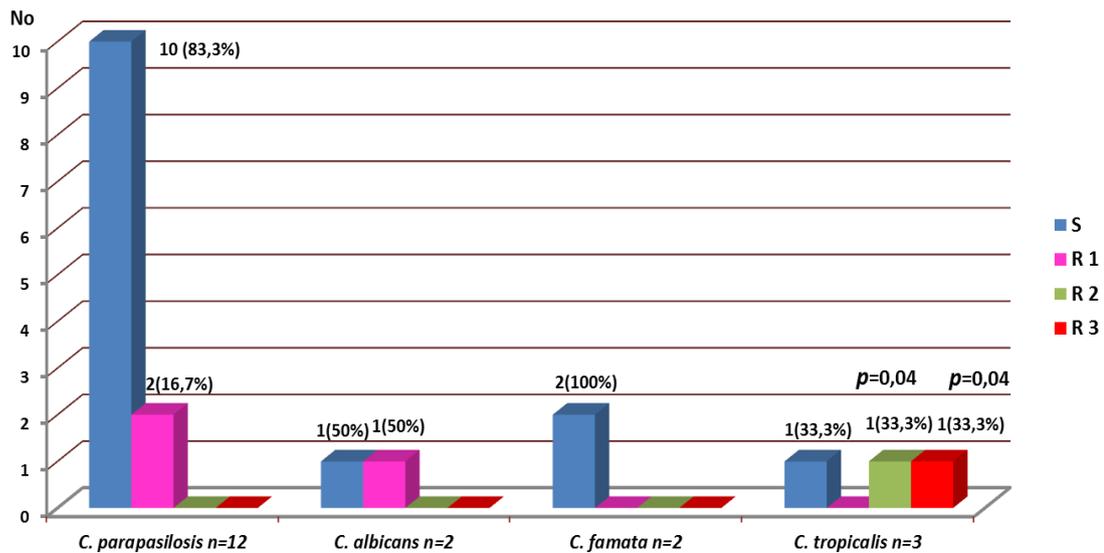


Figura IV.1 Patrones de resistencia obtenidos en 19 aislados de *Candida* provenientes de pacientes con otomicosis a fluocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol y ketoconazol. IPK 2018.

Leyenda: S- Sensible R1- Resistente a un antifúngico R2- Resistente a dos antifúngicos R3- Resistente a tres antifúngicos

En el presente estudio la resistencia antifúngica a dos y a tres antifúngicos presentó diferencia estadística significativa ($p=0,04$ y $p=0,04$) en *C. tropicalis* con respecto al resto de las especies, pero el número limitado de aislados no permite generalizar las conclusiones. Existe el consenso de que el incremento en el uso de esta droga es la causa principal de la tendencia ascendente de las infecciones por las especies no albicans, sin embargo, estudios que develen los mecanismos moleculares que expliquen este fenómeno aún son necesarios⁽¹⁴⁶⁾.

IV.2 Estudio de la actividad enzimática

Las especies comensales de *Candida* pueden tornarse patógenas para el hombre si el balance de la microbiota es alterado. La patogenicidad dependerá de factores tales como: estado inmunitario del hospedero, carga parasitaria y virulencia fúngica. Estos facilitan la invasión a los tejidos y evasión de las defensas del huésped ⁽¹⁴⁷⁾.

Entre las propiedades de la especie *Candida* que expliquen esta patogenicidad se encuentran diferentes factores de virulencia tales como: adherencia a los sustratos, formación del tubo germinativo, variabilidad fenotípica y genotípica, producción de toxinas y enzimas extracelulares ^(147, 148). La expresión de estos factores puede variar de acuerdo a la especie infectante, el área geográfica, el sitio, gravedad de la infección y reacción del hospedero. Entender estos elementos así como su relación con la patogenicidad puede convertirse en la herramienta principal que ayude a descubrir nuevas dianas para las drogas antifúngicas y así mejorar los esquemas terapéuticos existentes ⁽¹⁴⁸⁾.

En el presente estudio se realizó la determinación de producción de enzima fosfolipasa, proteinasa y hemolisina a los 19 aislados de *Candida* incluidos en la investigación (figura 2). Los dos de *C. albicans* (10,5%) fueron productores muy fuertes de enzima fosfolipasa ($Pz= 0,41$ y $0,42$). El resto de los aislados fue no productor (89,4%). En cuanto a la producción de enzima proteinasa: Un aislado de *C. parapsilosis* (5,2%) fue alto productor, uno de *C. famata*, uno de *C. parapsilosis* y los tres aislados de *C. tropicalis* fueron productores moderados (26,3%), el resto de los aislados (15,7%) no reveló producción de esta enzima. Todos los aislados (100%) mostraron producción de hemolisinas ($Pz < 0,69$).

IV.2.1 Producción de enzima fosfolipasa

Los 12 aislados de *C. parapsilosis* fueron no productores de enzima fosfolipasa. Este resultado concuerda con lo informado por Ramos ⁽¹⁴⁹⁾ y Riceto *et al* ⁽⁹⁸⁾ en Brasil en 16 aislados de candidiasis cutánea y diez aislados de muestras clínicas diversas respectivamente. Otros autores ⁽¹⁵⁰⁻¹⁵²⁾ publican un resultado similar. Ping *et al* en China ⁽¹⁵³⁾ informa un resultado diferente, en 20

aislados de muestras clínicas diversas el 90,5% exhibió producción de fosfolipasa.

Si bien la presencia o no de esta enzima ha demostrado que afecta la virulencia de *C. albicans*, su papel en la patogenia del complejo *C. parapsilosis* permanece vago. En estudios que comparan esta actividad enzimática entre aislados sistémicos y aislados cutáneos, algunos investigadores encuentran alta positividad solo en aislados sistémicos y otros solo en aislados de micosis superficiales. Algunos autores atribuyen estas diferencias al medio utilizado para medir la actividad enzimática, a un número de muestras insuficiente o a variaciones biológicas inherentes a los aislados siendo este último elemento el más importante de todos. La producción de fosfolipasa parece no estar asociada a la invasividad de *C. parapsilosis* ⁽¹⁵³⁾.

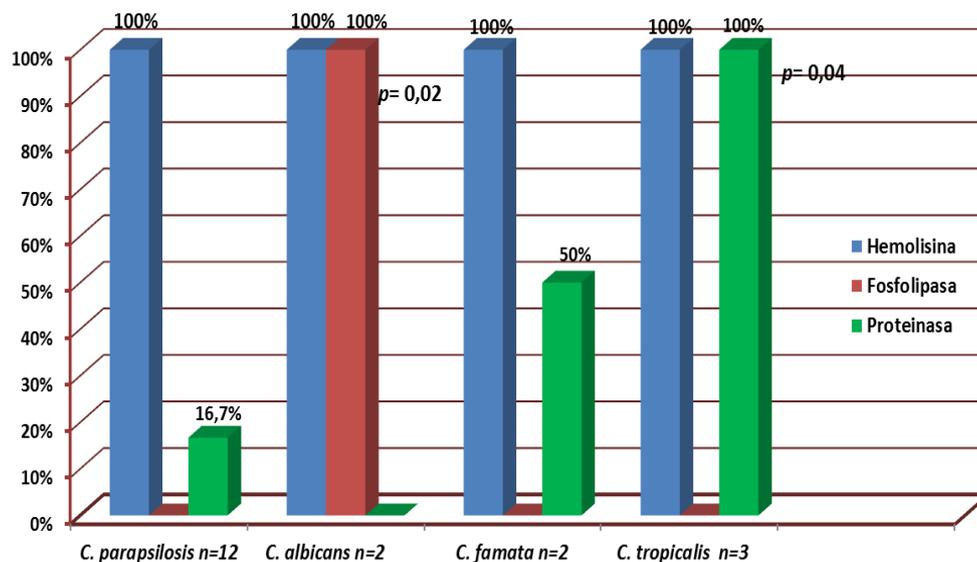


Figura IV.2 Distribución de la producción de hemolisina, fosfolipasa y proteinasa en 19 aislados de *Candida* provenientes de pacientes con otomicosis. IPK 2018.

De las cuatro fosfolipasas que secreta *C. albicans*, fosfolipasa B (FB) es la más importante. La virulencia de este hongo ha sido atenuada de forma experimental con la eliminación del gen *caPLB1* y restaurada con la reintroducción de este confirmándose así que FB juega un papel clave en la

infección y algunos autores han encontrado alta correlación entre la alta producción de esta enzima y el incremento de la resistencia a los azoles ⁽⁸⁶⁾.

Son múltiples los estudios que informan alta producción de enzimas fosfolipasas por *C. albicans* ^(95, 152, 154, 155) sin embargo Shirkhani *et al* en Irán ⁽¹⁴⁸⁾ en 34 aislados de candidiasis vulvovaginal informa que solo el 29,4% exhibió alta actividad. Algunos autores informan que la producción de estas enzimas es más alta en *C. albicans* que en otras especies ⁽¹⁵⁶⁾ sin embargo otros investigadores ^(17, 151) no encuentran diferencias. En la literatura consultada no se encontraron trabajos que determinaran la actividad de esta enzima en aislados de *Candida* provenientes de pacientes con otomicosis. La producción de fosfolipasa por *C. albicans* en el presente estudio presentó una diferencia estadística significativa ($p= 0,02$) pero el número limitado de aislados no permite arribar a conclusiones.

En el presente estudio no se constató producción de fosfolipasa por los dos aislados de *C. famata*. Este resultado coincide con lo publicado por Ramos *et al* en Brasil ⁽¹⁴⁹⁾ al estudiar 11 aislados de candidiasis cutánea y difiere con Shirkhani *et al* ⁽¹⁵⁰⁾ quienes informan producción de esta enzima en 13 aislados provenientes de pacientes con candidiasis vulvovaginal en Irán.

Los tres aislados de *C. tropicalis* del presente estudio fueron no productores de enzima fosfolipasa. Este resultado coincide con el trabajo de Yu *et al* ⁽¹⁵⁷⁾ en China quienes estudiaron 64 aislados de muestras clínicas diversas y no detectaron producción de fosfolipasas. Negri *et al* ⁽⁹⁶⁾ en Portugal en siete aislados provenientes de muestras clínicas diversas informan producción de esta enzima solo en uno, sin embargo, Deorukhkar en la India ⁽¹⁵⁸⁾ en 125 aislados de muestras clínicas diversas informa que el 57, 6% de estos mostraron actividad enzimática. Los investigadores han mostrado hallazgos contradictorios sobre la actividad de la enzima fosfolipasa en *C. tropicalis*. Estas inconsistencias pueden deberse a diferencias biológicas entre los aislados estudiados ⁽¹⁵⁸⁾. *C. tropicalis* parece tener una capacidad reducida para producir fosfolipasas extracelulares, esta producción depende de la cepa y del sitio de aislamiento ^(96, 159).

La ausencia de producción de estas enzimas en aislados clínicos debe ser interpretado con cuidado, enzimas hidrolíticas para otros sustratos distintos a los usados en el presente estudio y que tengan relevancia en infecciones cutáneas, deben ser investigadas ⁽¹⁶⁰⁾.

IV.2.2 Producción de enzima proteinasa

De los aislados de *C. parapsilosis*, uno (8,3%) fue altamente productor y otro bajo productor (8,3%). Diez fueron no productores (83,3%). Arsovic *et al* ⁽²⁰⁾ en Serbia, en dos aislados provenientes de pacientes con otomicosis informa uno productor y otro no productor. Tosun *et al* en Turquía ⁽¹³²⁾ en 42 aislados provenientes de muestras clínicas diversas informa producción de proteinasa en 13(31%). El resultado obtenido en el presente estudio difiere con la publicación de Shirkhani *et al* en Irán ⁽¹⁴⁸⁾, este autor en nueve aislados de micosis vulvovaginal informó que el 100% exhibió alta producción de esta enzima. Son varios los estudios que informan alta producción de proteinasa por *C. parapsilosis* ^(90, 149, 150, 153).

En *C. parapsilosis* se han identificado tres genes (*APSP1-3*) que codifican para enzimas proteasas. Dos de estos genes aún no se han caracterizado, *APSP1* ha sido bien definido desde el punto de vista bioquímico y *APSP2* codifica para una proteasa que constituye solo el 20% de las proteasas aisladas del sobrenadante de los cultivos. La expresión de estos tres 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 proteinasa que los que se obtienen de hemocultivos ⁽⁵¹⁾.

Los dos aislados de *C. albicans* fueron no productores de proteasas. Este hallazgo difiere con el informe de Arsovic *et al* en Serbia ⁽¹⁶¹⁾ que en dos aislados provenientes de niños con otomicosis encuentra alta producción de esa enzima. Existen varias investigaciones que informan alta producción de proteasas por *C. albicans* en todos los aislados en estudio ^(95, 148, 160), sin embargo existen otras publicaciones que informan aislados no productores.

Gokce *et al* en Turquía ⁽¹⁶²⁾ en 61 aislados de hemocultivos informa que el 10,3% no exhibe actividad proteínasa. Riceto *et al* ⁽⁹⁸⁾ en Brasil el evaluar 15 aislados de muestras clínicas diversas informa que el 74% (11) no produjo enzima proteasa.

La familia de las proteasas extracelulares (PE) está compuesta por diez miembros, PE1-8 son secretadas y liberadas al medio circundante mientras que PE9 y 10 permanecen unidas a la superficie celular. PE1-3 son indispensables para provocar daño al epitelio humano de manera experimental y contribuye a la patogenicidad de *C. albicans* durante la infección sistémica en ratones provocada de manera experimental. Sin embargo la relativa contribución de PE a la patogenia de las infecciones por *C. albicans* sigue siendo controversial, investigaciones recientes indican que PE no son necesarias para la invasión *in vitro* al epitelio humano y que PE1-6 no son imprescindibles para la virulencia en la candidiasis diseminada en ratones. Sin embargo, la gran cantidad de genes que codifican para PE en *C. albicans* comparada con otras especies menos invasivas sugiere que existe un papel dentro de la patogenia para este grupo de enzimas ⁽⁵³⁾.

Uno de los aislados de *C. famata* fue productor y el otro no. Arsovic *et al* en Serbia⁽²⁰⁾ informa un aislado productor proveniente de un paciente con otomicosis. Shirkhani en Irán ⁽¹⁴⁸⁾ informa actividad enzimática en 13 aislados provenientes de candidiasis vulvovaginal sin embargo Ramos *et al* en Brasil⁽¹⁴⁹⁾, en 11 aislados de candidiasis cutánea informa producción de esta enzima en siete (63,6%). En la literatura consultada no se pudo recoger información acerca del verdadero significado que tiene la producción de PE para esta especie de levadura.

Los tres aislados de *C. tropicalis* fueron productores de proteasas. Existen varias investigaciones que informan alta producción de estas enzimas por este hongo ^(96, 148, 149, 158, 163). *C. tropicalis* posee al menos cuatro genes que codifican para PE designadas SP1 hasta SP4 y estas se encuentran presentes en la superficie del hongo cuando este penetra los tejidos durante la infección diseminada o cuando evade los macrófagos durante la fagocitosis. La

expresión de PE durante la colonización del epitelio oral no está asociada a invasión y daño a los tejidos ⁽¹⁵⁹⁾. Se obtuvo diferencia estadística significativa ($p=0,04$) en cuanto a la producción de proteasas en esta especie en relación con el resto de los aislados pero debido al número limitado de estos no es posible llegar a conclusiones.

IV.2.3 Actividad hemolítica

Los 19 aislados (100%) presentaron actividad hemolítica en un rango de Pz entre 0,16 y 0,65. Son múltiples los estudios ^(91, 102, 147, 164-166) que publican resultados similares a los obtenidos en la presente investigación, sin embargo, Seneviratne *et al* ⁽¹⁶⁷⁾ en Hong Kong en nueve aislados de *C. parapsilosis* provenientes de pacientes con candidiasis sistémica informa actividad hemolítica solo en dos.

Los microorganismos patógenos pueden crecer utilizando la hemoglobina como fuente de hierro. Las hemolisinas producidas por *Candida* degradan este sustrato y facilitan la obtención del hierro elemental a partir de las células del hospedero. Estas enzimas son consideradas un factor de virulencia clave que le permite al microorganismo sobrevivir y persistir en ese ambiente ⁽¹⁵⁹⁾. A pesar de que se ha demostrado con suficientes evidencias la capacidad hemolítica de las especies de *Candida*, algunas preguntas aún permanecen sin responder como son: cuál es la naturaleza bioquímica del factor hemolítico y cuáles son las bases moleculares de su expresión. Futuras investigaciones son necesarias para comprender el papel que juega la actividad hemolítica en la patogénesis de las enfermedades por *Candida* ⁽¹⁶⁸⁾.

IV.3 Correlación entre factores de virulencia y resistencia antifúngica

En la literatura consultada son muy pocos los estudios que indagan sobre la relación entre los factores de virulencia y la resistencia antifúngica. En el presente estudio la producción de fosfolipasa se produjo solo por *C. albicans*, por la cepa susceptible y por la resistente (figura 3).

Yin *et al* en China ⁽⁸⁶⁾, en un estudio realizado con 15 cepas susceptibles y 15 resistentes al fluconazol describe mayor producción de esta enzima en las

resistentes. Estas últimas exhibieron sobreexpresión del gen *MDR* que codifica para las bombas de eflujo MDR (multidrogas resistentes). Este autor concluye que existe correlación entre la actividad fosfolipasa y la resistencia a los antifúngicos y que la fosfolipasa puede jugar un papel importante en emergencia de la resistencia a los azoles. igual resultado informa Lyon en Brasil ⁽¹⁶⁹⁾, sin embargo Pinto *et al* en Portugal ⁽¹⁷⁰⁾ no encuentra relación entre la producción de esta enzima y las CMI obtenidas y tampoco encuentra diferencia estadística significativa en la producción de esta enzima entre los aislados obtenidos de pacientes enfermos y los provenientes de pacientes sanos.

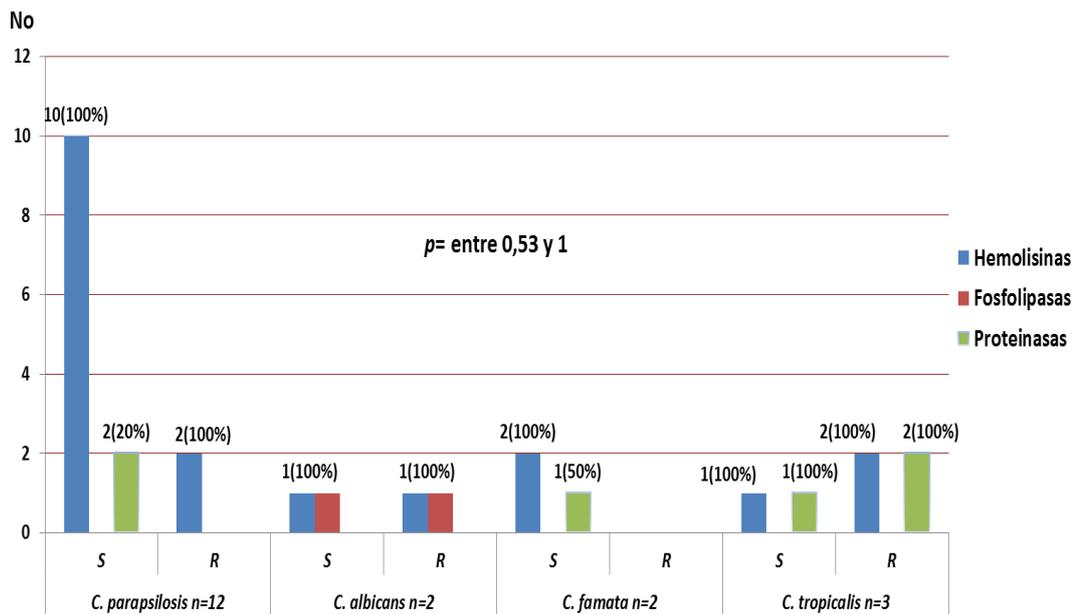


Figura IV.3 Distribución de la producción de hemolisina, fosfolipasa y proteinasa entre aislados sensible y resistente de *Candida* provenientes de pacientes con otomicosis. IPK 2018.

Leyenda: S- Sensible, R- Resistente

La producción de proteinasas solo se demostró en los tres aislados de *C. tropicalis*, dos resistentes, uno a dos antifúngicos y el otro a tres (azoles). Seifi *et al* en Irán ⁽¹⁵¹⁾ no encuentra una correlación significativa entre la producción de esta enzima y las CMI obtenidas de FCZ y AMB. Deorukhkar *et al* en la India ⁽¹⁵⁸⁾ encuentra correlación entre la resistencia a FCZ, producción

de enzimas fosfolipasas y producción de biopelícula pero no con la producción de proteasas. En el presente estudio no hubo diferencia estadística significativa para la producción de este grupo de enzimas entre los aislados de *C. tropicalis* resistentes y el aislado susceptible, hecho que carece de significado por el tamaño de la muestra.

No hubo diferencias en la producción de hemolisinas entre los aislados sensibles y los aislados resistentes de las cuatro especies.

En la literatura consultada no se encontraron estudios que correlacionaran la actividad hemolítica de *Candida* con la resistencia antifúngica. Este factor contribuye a la patogenicidad de este género y algunos aspectos biológicos relacionados con su habilidad hemolítica continúan aún inexplorados ⁽¹⁶⁸⁾.

Conclusiones

- 1- El porcentaje de aislados sensibles frente a los antifúngicos estudiados, indican la posibilidad de mantener su aplicación en el tratamiento de estas infecciones en los pacientes que concurren a la consulta de ORL del HCQ "Manuel Fajardo".
- 2- La buena concordancia obtenida entre los dos métodos para determinar la susceptibilidad ratifica la confiabilidad del método comercial en la práctica diaria en el LNR.
- 3- La presencia de al menos dos factores de virulencia enzimáticos en todas las especies de *Candida* estudiadas, indica la posibilidad que tienen los aislados investigados de transformarse de microorganismos comensales a patógenos.
- 4- El porcentaje de los factores de virulencia fue similar en el grupo de aislados sensibles que en el de los resistentes, lo que manifiesta que la producción de los mismos no está asociada con la resistencia en los aislados objeto de estudio.

Recomendaciones

- 1- Determinar por métodos genotípicos los mecanismos de resistencia en los aislados estudiados.
- 2- Desarrollar nuevos estudios que permitan identificar otros factores de virulencia en estos aislados.

Bibliografía:

1. Aneja K SC, Joshi R. Fungal infection of the ear: a common problem in the north eastern part of Haryana. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2010;74:604-7.
2. Salazar M.I. Caracterización clínica micológica en pacientes adultos con diagnóstico presuntivo de Otomicosis en el Hospital Enrique Cabrera. 2010 [Tesis de Especialista de 1er grado en Microbiología]. La Habana: I.P.K; 2011.
3. da Silva Pontes Z FA, de Oliveira Lima E , de Holanda M , Cavalcanti N , Farias M et al. Otomicosis: um estudo retrospectivo. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009;75:367-70.
4. Satish H VB, Manjuladevi.M A Clinical Study of Otomycosis *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)* 2013;5:57-62.
5. Boronat-Echeverría E EAM, Méndez-Tovar L. Otitis externa micótica en pacientes con otitis media crónica. *AN ORL MEX*. 2005;50:45-55.
6. Álvarez Amador Héctor Eduardo, Santana Álvarez Jorge, Castillo Toledo Luis, Guarina García García Eneyda, Álvarez Urbay María Antonieta. Comportamiento de la otitis externa en pacientes diabéticos. *AMC [Internet]*. 2010 Oct [citado 2016 Mayo 20] ; 14(5): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552010000500009&lng=es.
7. García P GR, Domínguez I, Noval JA. Otomicosis: aspectos clínicos y microbiológicos. *Rev Diagn Biol*. 2001;50:17-22.
8. Hueso P JÁS, Gil-Carcedo Sañudo E , Gil-Carcedo García L.M , Ramos Sánchez C, VallejoValdezate L.A. Diagnóstico de presunción: Otomicosis. Estudio de 451 pacientes. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2005;56:181-6.
9. Aswani V SS. Two Unusual Pediatric Cases of Fungal Infections in Farming Families. *Journal of Agromedicine*. 2011;16:153-7.
10. García L AP, Galàn F , García P , Marín P , Rodríguez M. Otomycosis due to Filamentous Fungi. *Mycopathologia*. 2011;172:307-10.
11. Gokale Sh SS, Baragundi M, Anushka D, Manjula R. Otomycosis : A Clinico Mycological Study *Int J Med Health Sci*. 2013;2:218-23.
12. Papon N CV, Clastre M, Benne R J. Emerging and Emerged Pathogenic Candida Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. *PLOS Pathogens*. 2013;9(9).
13. Zomorodian K, Bandegani A, Mirhendi H, Pakshir K, Alinejhad N, Poostforoush Fard A. In Vitro Susceptibility and Trailing Growth Effect of Clinical Isolates of Candida Species to Azole Drugs. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;9(2):e28666.
14. Spampinato C LD. Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International*. 2013;2013.
15. Zhang L, Zhou S, Pan A, Li J, Liu B. Surveillance of antifungal susceptibilities in clinical isolates of Candida species at 36 hospitals in China from 2009 to 2013. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2015;33:1-4.

16. Zomorodian K, Rahimi MJ, Pakshir K, Motamedi M, Ghiasi MR, Rezashah H. Determination of antifungal susceptibility patterns among the clinical isolates of *Candida* species. *J Glob Infect Dis.* 2011;3(4):357-60.
17. Udayalaxmi J, Shenoy N. Comparison Between Biofilm Production, Phospholipase and Haemolytic Activity of Different Species of *Candida* Isolated from Dental Caries Lesions in Children. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR.* 2016;10(4):DC21-3.
18. Tellapragada Ch KV, Johar R, Shaw T, Malik N, Bhat P et al. Antifungal Susceptibility Patterns, In Vitro Production of Virulence Factors, and Evaluation of Diagnostic Modalities for the Speciation of Pathogenic *Candida* from Blood Stream Infections and Vulvovaginal Candidiasis. *Journal of Pathogens.* 2014;2014:8pages.
19. Arsenijevi V et al. PROTEASE ACTIVITIES OF *CANDIDA SPP.* ISOLATED FROM IMMUNOCOMPETENT PATIENTS WITH OTOMYCOSIS. *Jugoslov Med Biohem.* 2004;23:171-4.
20. Arsovic NA, Banko AV, Dimitrijevic MV, Djordjevic VZ, Milovanovic JP, Arsenijevic VA. Protease activities of *Candida* spp. isolated from otitis externa: preliminary result. *Acta chirurgica Iugoslavica.* 2009;56(3):113-6.
21. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clinical microbiology reviews.* 2013;26(2):185-230.
22. Beceiro A, Tomas M, Bou G. [Antimicrobial resistance and virulence: a beneficial relationship for the microbial world?]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(8):492-9.
23. Cuadro básico de medicamentos/ Colectivo de autores. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2014. 103 .
24. Vennewald I KE. Otomycosis:Diagnosis and treatment. *Clinics in Dermatology.* 2010:202-11.
25. Kiakojuri K, Rajabnia R, Jalili B, Khafri S y Mahdavi S. Otomycosis in Adolescent Patients Referred to the Therapeutic Center in Babol City, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8:e17138.
26. Latha R, Sasikala R y Muruganandam N. Chronic Otomycosis Due to *Malassezia* Spp. *J Glob Infect Dis.* 2010;2:189–90.
27. Ozcan M OK, Karaarslan A ,Karaarslan F. Concomitant otomycosis and dermatomycoses: a clinical and microbiological study. *Eur Arch Otorhinolaryngo.* 2003;260:24-7.
28. Viswanatha B NK. Fungal Infections of the Ear in Immunocompromised Host: a Review. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2011;3.
29. Arenas R. Otomicosis. In: Sosa DMAT, editor. *Micología Médica Ilustrada.* 3ra ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana 2008. p. 123-6.
30. Bonifaz A. Otomicosis. In: Méndez Cervantes F MOF, editor. *Micología Médica Básica.* 2 ed. Mexico Mendez Editores p. 461-7.
31. Chandra S KS, Shekhar M, Dinaker N, et al Primary Otomycosis in the Indian Subcontinent: Predisposing Factors, Microbiology, and Classification. *Int J Microbiol.* 2014;2014.
32. Jia X LQ, Chi F y Cao W. Otomycosis in Shanghai: aetiology, clinical features and therapy. *Mycoses.* 2012;2012: 404–9.
33. Anwar K GM. Otomycosis; clinical features, predisposing factors and treatment implications *Pak J Med Sci.* 2014;30:564-7.
34. Mgbor N GH. Otomycosis in Nigeria: treatment with mercurochrome. *Mycoses.* 2001;44:395-7.

35. Ruz S BH, Corsen C . Otitis externa micótica y perforación timpánica: Reporte de dos casos. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello*. 2010;70:245-52.
36. Barati B OS, Goljanian A, Omrani M. Otomycosis in Central Iran: A Clinical and Mycological Study *Iran Red Crescent Med J*. 2011;13:373-6.
37. Enweani B y Igumbor H. Prevalence of otomycosis in malnourished children in Edo State, Nigeria. *Mycopathologia*. 1998;140:85-7.
38. Otomicosis. *Guías de Atención y Procedimientos en Otorrinolaringología de la Sociedad Peruana de Otorrinolaringología y Cirugía Facial Edición 70 Aniversario* ed. Peru2010. p. 16-7.
39. A Rafiei y N Amirrajab. Fungal Contamination of Indoor Public Swimming Pools, Ahwaz, South-west of Iran *Iranian J Publ Health*. 2010;39: 124-8
40. Bustamante W RJ, Marín M, . Un caso de otomicosis causada por *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.* y *Candida albicans*. *Rev méd Hosp Nac Niños (Costa Rica)*. 1998;33:43-7.
41. Panchal P PJ, Patel D, Rathod S, Shah P. Analysis of various fungal agents in clinically suspected cases of otomycosis *Indian Journal of Basic & Applied Medical Researc*. 2013;8(8):865-9.
42. Mishra G MN, Pal M. Chronic bilateral otomycosis caused by *Aspergillus niger*. *Blackwell Publishing Ltd • Mycoses*. 2004;47:82-4.
43. Nowrozi H DAF, Ghaffarnejad Mehraban H ,Tavakoli A ,Ghooshchi G. Mycological and clinical study of Otomycosis in Tehran, Iran *BEPLS*. 2014;3:29-31.
44. Hoshino T MM. Otomycosis: subdermal growth in calcified mass. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2006;263:875-8.
45. Hay R. Fungal infections of the ear, nose and throat. In: Klibbler C MWyOF, editor. *Principles and Practice of Clinical Mycology* 1ed. England: John Wiley and sons; 1996. p. 131-3.
46. Eingun Song J JHT, Patel R, I. Redleaf M. Fungal otitis externa as a cause of tympanic membrane perforation: A case series. *ENT-Ear, Nose & Throat Journal*. 2014;93:332-6.
47. Perry J y Miller G. Quality Control Slide for Potassium Hydroxide and Cellufluor Fungal Preparations. *J CLIN MICROBIOL*. 1989;27: 1411-2.
48. Linares M SF. Diagnostico microscópico de las micosis. 2007. In: *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica [Internet]*. Bilbao; [1-14].
49. Suarez et al. *Otología*. 2004. In: *Otorrinolaringología [Internet]*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. 2da. [64-129].
50. Arenas R. *Micosis oportunistas*. 2014. In: *Micología Médica Ilustrada [Internet]*. Mexico: Mc Graw Hill. 5ta Edición. [240-7].
51. Sonia Silva MN, Mariana Henriques, Ros´ario Oliveira, David W. Williams & Joana Azeredo. *Candida glabrata* , *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance *Microbiol Rev*. 2011;36: 288–305.
52. Li L, Zhang Ch y Konopka J. A *Candida albicans* Temperature-Sensitive cdc12-6 Mutant Identifies Roles for Septins in Selection of Sites of Germ Tube Formation and Hyphal Morphogenesis. *Eukaryotic Cell*. 2012;11:1210 8.
53. Mayer F, Wilson D y Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4:119-28.

54. Lettner et al. *Candida albicans* AGE3, the Ortholog of the *S. cerevisiae* ARF-GAP-Encoding Gene GCS1, Is Required for Hyphal Growth and Drug Resistance. PLoS ONE. 2010;5(8):e11993.
55. Jordan et al. *albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* invasive infections in the PICU: clinical features, prognosis and mortality. Rev Esp Quimioter. 2014;27:56-62.
56. Heather T. Taff JEN, Robert Zarnowski, Kelly M. Ross, Hiram Sanchez, Mike T. Cain, Jessica Hamaker, Aaron P. Mitchell, David R. Andes. A *Candida* Biofilm-Induced Pathway for Matrix Glucan Delivery: Implications for Drug Resistance. PLoS Pathogens 2012;8(8 | e1002848).
57. Trofa D, Gácsér A y Nosanchuk J. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. CLIN MICROBIOL REV. 2008;21: 606–25
58. Singaravelu K, Gácsér A y Nosanchuk J. Determinantes genéticos de la virulencia de *Candida parapsilosis*. Rev Iberoam Micol. 2014;31:16-21.
59. Kothavade et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole Journal of Medical Microbiology 2010;59:873-80.
60. Dornelas-Ribeiro et al. Cellular characterisation of *Candida tropicalis* presenting fluconazole-related trailing growth. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:31-8.
61. Rodrigues C, Silva S y Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;2014:673–88
62. Tapia C . *Candida glabrata*. British microbiology research journal. 2008;25:293.
63. Fidel P, Vasquez J y Sobel J. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans* CLINMICROBIOLREV. 1999;12:80–96
64. Cecilia V y Tapia P. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. Rev Chil Infect. 2009;26: 144-50.
65. Duarte et al. Comparación de métodos de microdilución CLSI M27-A2 y EUCAST en aislamientos de *Candida* spp. en pacientes con cáncer. Infectio. 2010;14:5107-15.
66. Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M y Cantón E. EUCAST and CLSI: Working Together Towards a Harmonized Method for Antifungal Susceptibility Testing. Curr Fungal Infect Rep 2013;7:59–67.
67. Pfaller M EA, Boyken L, Hollis, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S et al. Comparison of the Broth Microdilution (BMD) Method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-Hour CLSI BMD Method for Testing Susceptibility of *Candida* Species to Fluconazole, Posaconazole, and Voriconazole by Use of Epidemiological Cutoff Values. British microbiology research journal. 2011;49:845-50.
68. Cantón E ME, Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Revista Iberoamericana de Micología 2007:15a-b-6.
69. Eraso et al. Evaluación comparativa de ATB Fungus 2 y Sensititre YeastOne en el estudio de la sensibilidad in vitro de *Candida* a los antifúngicos Rev Iberoam Micol. 2008;25:3-6.
70. Zhang et al. The Widely Used ATB FUNGUS 3 Automated Readings in China and Its Misleading High MICs of *Candida* spp. to Azoles: Challenges for Developing Countries' Clinical Microbiology Labs. PLoS ONE. 2014;9:e114004.
71. Maldonado et al. Evaluación de tres métodos para la detección de la sensibilidad in vitro de especies de *Candida* a los antifúngicos Revista Argentina de Microbiología. 2011;43:120-5.

72. Cantón E, Cuenca-Estrella M y Rodríguez-Tudela J. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20:523-30.
73. Zabek et al. Activity of fluconazole and its Cu(II) complex towards *Candida* species. *Med Chem Res*. 2015;2015:2005–10.
74. Prasad R y Rawal M. Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Frontiers in Pharmacology*. 2014;5:13 pages.
75. Golabek et al. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs *Acta Biol*. 2015;62.
76. Espinel A. Mecanismos de resistencia a los antifúngicos: levaduras y hongos filamentosos *Rev Iberoam Micol*. 2008;25:101-6.
77. Pfaller et al. *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J CLINMICROBIOL*. 2008;46:515-21.
78. Cuenca Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias *Rev Esp Quimioter*. 2010;23:169-76.
79. Bondaryk M KW, Staniszewska M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Postępy Dermatologii i Alergologii*. 2013;5:293-301.
80. Arendrup M. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;20 (Suppl 6):42-8.
81. Cuenca-Estrella M AIA, Gómez A y Monzon A. Estudio de sensibilidad en levaduras. Actualización y novedades. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(Supl 1):53-8.
82. Pfaller M BL, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, and Diekema D. Use of Epidemiological Cutoff Values To Examine 9-Year Trends in Susceptibility of *Aspergillus* Species to the Triazoles *J CLINMICROBIOL*. 2011;49: 586–90
83. C. Lass-Flori. Susceptibility testing in *Aspergillus* species complex. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:49-53.3.
84. Laura Estela Castrillón Rivera APR, Carmen Padilla Desgarenes. Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatología Rev Mex*. 2005;49:12-27.
85. 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;145(5):635-40.
86. Ying S, Chunyang L. Correlation between phospholipase of *Candida albicans* and resistance to fluconazole. *Mycoses*. 2012;55(1):50-5.
87. Mattei AS, Alves SH, Severo CB, Guazzelli Lda S, Oliveira Fde M, Severo LC. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(3):340-2.
88. Ombrella AM, Racca L, Ramos L. [Protease and phospholipase activities of *Candida albicans* isolated from vaginal secretions with different pH values]. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25(1):12-6.

89. Luo G SL y YJ. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities J Clin Microbiol. 2001;39:2971-4.
90. Franca E et al. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. Mycoses. 2009;54: e44–e51.
91. Rossoni R et al. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans* *Candida* species. Braz Oral Res, (São Paulo). 2013;27:484-9.
92. Arenas R . Diagnostico de Laboratorio. In: Sosa DMAT, editor. Micología Médica Ilustrada 3ra ed. México Mc Graw-Hill Interamericana 2008. p. 40-60.
93. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standar- Third Edition CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008
94. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. Oral microbiology and immunology. 2005;20(6):349-53.
95. Marcos-Arias C EE, Madariaga L, Aguirre JM, Quindo G. . Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. Mycoses. 2009;54.
96. Negri M MM, Henriques M, Terezinha I. E. Azeredo J, Oliveira R. Examination of Potential Virulence Factors of *Candida tropicalis* Clinical Isolates From Hospitalized Patients. Mycopathologia. 2010;169:175-82.
97. Price MF WI, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida Albicans*. Sabouradia. 1982;20:7-14.
98. Riceto E MR, Amante MP y dos Santos Pedroso R. . Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species Rev Iberoam Micol. 2015;32:79-82.
99. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN. Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79(2):198-204.
100. Pita Fernández S PDS. La fiabilidad de las mediciones clínicas: el análisis de concordancia para variables numéricas 2004 [cited 2018. Available from: www.fisterra.com.
101. López de Ullibarri Galparsoro I PF, S. Medidas de concordancia: el índice de Kappa 1999 [cited 2018. Available from: www.fisterra.com.
102. Neji S, Hadrach I, Trabelsi H, Abbes S, Cheikhrouhou F, Sellami H, et al. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. Journal of Biomedical Science. 2017;24(1):67.
103. Bicmen C, Doluca M, Gulat S, Gunduz AT, Tuksavul F. Species level identification and antifungal susceptibility of yeasts isolated from various clinical specimens and evaluation of Integral System Yeasts Plus. The new microbiologica. 2012;35(3):327-34.
104. Canto E PJ, Quindo G, Eraso E, Miranda II, Álvarez M et al. Prospective Multicenter Study of the Epidemiology, Molecular Identification, and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* Isolated from Patients with Candidemia. ANTIMICROBAGENTS CHEMOTHER. 2011;55:5590–6
105. Ostrosky et al. - Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(10):3149-54.
106. Asbec et al. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility Critical Reviews in Microbiology 2009;35.

107. Fernández et al. Sensibilidad de aislamientos clínicos de *Candida albicans* frente a la 5-fluorocitosina. *REV CUBANA MED TROP*. 2000;53(3):191-6.
108. Pfaller M AD, Diekema D, Horn D, Reboli A, Rotstein C et al Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non -albicans Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008. *PLOS ONE*. 2014;9(7): e101510.
109. MA P, Diekema Dj Fau - Messer SA, Messer Sa Fau - Boyken L, Boyken L Fau - Hollis RJ, Hollis Rj Fau - Jones RN, RN J. - In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):78-83.
110. Ozcelik B. In vitro susceptibility of *Candida* species isolated from cancer patients to some antifungal agents. *Drug Metabol Drug Interact*. 2004;20(1-2):101-8.
111. St-Germain et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2008;19:55-62.
112. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema DJ, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):2040-6.
113. Zhang L, Wang H, Xiao M, Kudinha T, Mao LL, Zhao HR, et al. The Widely Used ATB FUNGUS 3 Automated Readings in China and Its Misleading High MICs of *Candida* spp. to Azoles: Challenges for Developing Countries' Clinical Microbiology Labs. *PLoS One*. 2014;9(12).
114. Fernandez et al. Sensibilidad in vitro de cepas de *Candida* frente a fluconazol y anfotericina B. *Rev Cubana Med Trop* 2007;59.
115. Bendjelloul M, Boucherit- Otmani Z, Boucherit K. Study of strains of *Candida* spp. Isolated from catheters in UHC of Oran (Algeria): Identification and antifungal susceptibility. *Journal de mycologie medicale*. 2016;26(3):212-6.
116. Pharkjaksu S, Chongtrakool P, Suwannakarn K, Ngamskulrungraj P. Species distribution, virulence factors, and antifungal susceptibility among *Candida parapsilosis* complex isolates from clinical specimens at Siriraj Hospital, Thailand, from 2011 to 2015. *Med Mycol*. 2017.
117. da Silva BV, Silva LB, de Oliveira DB, da Silva PR, Ferreira-Paim K, Andrade-Silva LE, et al. Species Distribution, Virulence Factors, and Antifungal Susceptibility Among *Candida parapsilosis* Complex Isolates Recovered from Clinical Specimens. *Mycopathologia*. 2015;180(5-6):333-43.
118. Yang YL et al. Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infection control and hospital epidemiology*. 2004;25(1):60-4.
119. Ataides FS, Costa CR, Souza LK, Fernandes O, Jesuino RS, Silva Mdo R. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* complex species isolated from culture collection of clinical samples. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(4):454-9.
120. Lockhart S IN, Cleveland A , Farley M, Harrison L, Bolden C et al. Species Identification and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Bloodstream Isolates from Population-Based Surveillance Studies in Two U.S. Cities from 2008 to 2011. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50:3435–42.

121. Yalaz M Fau - Akisu M, Akisu M Fau - Hilmioglu S, Hilmioglu S Fau - Calkavur S, Calkavur S Fau - Cakmak B, Cakmak B Fau - Kultursay N, N K. - Successful caspofungin treatment of multidrug resistant *Candida parapsilosis* septicaemia in an extremely low birth weight neonate. *Mycoses*. 2006;49(3):242-5.
122. Tunkel AR, Thomas Cy Fau - Wispelwey, B. Wispelwey B. *Candida* prosthetic arthritis: report of a case treated with fluconazole and review of the literature. *The American journal of medicine*. 1993;94(1):100-3.
123. Fernández et al. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. *Rev Cubana Med Trop*. 1998;50(1):48-53.
124. Subramanya SH, Baral BP, Sharan NK, Nayak N, Metok Y, Sathian B, et al. Antifungal susceptibility and phenotypic virulence markers of *Candida* species isolated from Nepal. *BMC research notes*. 2017;10(1):543.
125. Peron IH, Reichert-Lima F, Busso-Lopes AF, Nagasako CK, Lyra L, Moretti ML, et al. Resistance Surveillance in *Candida albicans*: A Five-Year Antifungal Susceptibility Evaluation in a Brazilian University Hospital. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158126.
126. Sharifynia S, Badali H, Sharifi Sorkherizi M, Shidfar MR, Hadian A, Shahrokhi S, et al. In Vitro Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida albicans* Complex Isolated from Patients with Respiratory Infections. *Acta Med Iran*. 2016;54(6):376-81.
127. Beyda ND, Chuang SH, Alam MJ, Shah DN, Ng TM, McCaskey L, et al. Treatment of *Candida famata* bloodstream infections: case series and review of the literature. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(2):438-43.
128. Yesudhasan BL, Mohanram K. *Candida tropicalis* as a Predominant Isolate from Clinical Specimens and its Antifungal Susceptibility Pattern in a Tertiary Care Hospital in Southern India. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2015;9(7):DC14-6.
129. Zuza-Alves DL, de Medeiros S, de Souza L, Silva-Rocha WP, Francisco EC, de Araújo MCB, et al. Evaluation of Virulence Factors In vitro, Resistance to Osmotic Stress and Antifungal Susceptibility of *Candida tropicalis* Isolated from the Coastal Environment of Northeast Brazil. *Front Microbiol*. 2016;7.
130. Baghdadi E, Khodavaisy S, Rezaie S, Abolghasem S, Kiasat N, Salehi Z, et al. Antifungal Susceptibility Patterns of *Candida* Species Recovered from Endotracheal Tube in an Intensive Care Unit. *Advances in medicine*. 2016;2016:9242031.
131. Scorzoni L, de Paula e Silva ACA, Marcos CM, Assato PA, de Melo W, de Oliveira HC, et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Front Microbiol*. 2017;8.
132. Tosun I, Akyuz Z, Guler NC, Gulmez D, Bayramoglu G, Kaklikkaya N, et al. Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. *Med Mycol*. 2013;51(5):483-92.
133. Zhang L, et al. Development of fluconazole resistance in a series of *Candida parapsilosis* isolates from a persistent candidemia patient with prolonged antifungal therapy. *BMC Infect Dis*. 2015;15(340):015-1086.
134. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. *Front Microbiol*. 2016;7.
135. Yenisehirli G, Bulut N, Yenisehirli A, Bulut Y. In Vitro Susceptibilities of *Candida albicans* Isolates to Antifungal Agents in Tokat, Turkey. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(9):e28057.

136. Torres-Rodriguez J y Alvarado-Ramirez E. In vitro susceptibilities to yeasts using the ATBw FUNGUS 2 method, compared with Sensititre Yeast Onew and standard CLSI (NCCLS) M27-A2 methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007;60:658-61.
137. Jerez Puebla LEF, C. M.; Illnait, M. T.; Perurena, M. R.; Rodríguez, I.; Martínez, G. Susceptibilidad in vitro de candida spp. aisladas de la cavidad oral de pacientes VIH/sida a itraconazol, clotrimazol y ketoconazol *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2012;31:80-4.
138. Arias A et al. In vitro susceptibility of 545 isolates of *Candida* spp. to four antifungal agents. *Mycoses*. 1994;37(7-8):285-9.
139. Badiee P et al. - Distributions and antifungal susceptibility of *Candida* species from mucosal sites in HIV positive patients. *Arch Iran Med*. 2010;13(4):282-7.
140. Taura DW MM, Koki AM, Musa MG. Antifungal Resistance Among *Candida* species From Patients with Genitourinary Tract Infection at Muhammad Abdullahi Wase Specialist Hospital, Kano. *Nigerian J Basic Appl Sci*. 2013;21.
141. Goulart LS, Santiago EF, Ramon JL, Moura SV, Silva AR, Silva Jr IF, et al. Species distribution and antifungal susceptibility to vulvovaginal *Candida* spp. in southern Mato Grosso State, Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2016;52:233-7.
142. V. Krcmery V. Krcmery Jr. DS, E. Pichnova Breakthrough *Candida tropicalis* Fungemia during Ketoconazole Prophylaxis in Cancer Patients. *Acta Oncologica*. 1999;38:663-5.
143. Gupta A LD. The Rise and Fall of Oral Ketoconazole. *J Cutan Med Surg*. 2015;19:352-7.
144. Perlin DS, Shor E, Zhao Y. Update on Antifungal Drug Resistance. *Current clinical microbiology reports*. 2015;2(2):84-95.
145. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine*. 2012;125(1 Suppl):S3-13.
146. Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP, Chaves GM. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. *Front Microbiol*. 2017;8:1927.
147. Melo Riceto E PMR, Amante Penatti M y dos Santos Pedroso R. La actividad enzimática y hemolítica en diferentes especies de *Candida*. *Rev Iberoam Mico*. 2015;32:79-82.
148. Shirkhani, S. Sepahvand, A. Mirzaee, M. Anbari, K. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* spp. isolates from vulvovaginitis in Iran. *Journal de mycologie medicale*. 2016;26(3):255-60.
149. Ramos Lde S, Barbedo LS, Braga-Silva LA, dos Santos AL, Pinto MR, Sgarbi DB. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol*. 2015;32(2):122-5.
150. Shirkhani S, Sepahvand A, Mirzaee M, Anbari K. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* spp. isolates from vulvovaginitis in Iran. *Journal de mycologie medicale*. 2016;26(3):255-60.
151. Seifi Z, Zarei Mahmoudabadi A, Zarrin M. Extracellular Enzymes and Susceptibility to Fluconazole in *Candida* Strains Isolated From Patients With Vaginitis and Healthy Individuals. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(3).
152. Kantarcioglu S y Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2001;14:160-5.
153. Ping Y XG, Nian Y, Da W. In Vitro Evaluation of Phospholipase, Proteinase and Esterase Activities of *Candida parapsilosis* and *Candida metapsilosis*. *Mycopathologia*. 2011;172:429-38.

154. Atalay et al. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood cultures. *Nigerian Journal of Clinical Practice* 2015;18(1):52-5.
155. Antonella Souza Mattei SHA, Cecília Bittencourt Severo, Luciana da Silva Guazzelli, Flávio de Mattos Oliveira and Luiz Carlos Severo. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans* *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46:340-2.
156. Tellapragada C, Eshwara VK, Johar R, Shaw T, Malik N, Bhat PV, et al. Antifungal susceptibility patterns, in vitro production of virulence factors, and evaluation of diagnostic modalities for the speciation of pathogenic *Candida* from blood stream infections and vulvovaginal candidiasis. *J Pathog*. 2014;2014:142864.
157. Yu S, Li W, Che J, Bian F, Lu J, Wu Y. [Study on virulence factors of *Candida tropicalis* isolated from clinical samples]. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi*. 2015;36(10):1162-6.
158. Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. *Int J Microbiol*. 2014;2014:456878.
159. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012;36(2):288-305.
160. Ramos L de S. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol*. 2015;32(2):122-5.
161. Arsovic NA et al. Protease activities of *Candida* spp. isolated from otitis externa: preliminary. *Acta chirurgica iugoslavica*. 2009;56(3):113-6.
162. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia*. 2007;164(6):265-9.
163. Alenzi FQ. Virulence factors of *Candida* species isolated from patients with urinary tract infection and obstructive uropathy. *Pak J Med Sci*. 2016;32(1):143-6.
164. Fatahinia M, Poormohamadi F, Zarei Mahmoudabadi A. Comparative Study of Esterase and Hemolytic Activities in Clinically Important *Candida* Species, Isolated From Oral Cavity of Diabetic and Non-diabetic Individuals. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(3).
165. Ramesh N, Priyadharsini M, Sumathi CS, Balasubramanian V, Hemapriya J, Kannan R. Virulence Factors and Anti Fungal Sensitivity Pattern of *Candida* Sp. Isolated from HIV and TB Patients. *Indian journal of microbiology*. 2011;51(3):273-8.
166. Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SF, Jorge AO, Junqueira JC. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *Brazilian oral research*. 2013;27(6):484-9.
167. Seneviratne CJ, Rajan S, Wong SS, Tsang DN, Lai CK, Samaranayake LP, et al. Antifungal Susceptibility in Serum and Virulence Determinants of *Candida* Bloodstream Isolates from Hong Kong. *Front Microbiol*. 2016;7:216.
168. Furlaneto MC. How much do we know about hemolytic capability of pathogenic *Candida* species? *Folia Microbiol*. 2018;15(10):018-0584.
169. Lyon JP de Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(5):632-8.

BIBLIOGRAFÍA

170. Pinto E. Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida* species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(10):587-92.

Anexos

Anexo 1: Cepas que serán utilizadas como controles en la determinación de factores de virulencia y en la prueba de susceptibilidad

Cepas controles para validar método de referencia de susceptibilidad de levaduras	
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
Cepa control para validar método de actividad fosfolipasa	
Control positivo: <i>C.albicans</i> ATCC 90028	
Cepa control para validar método de actividad proteasa	
Control positivo: <i>C.albicans</i> ATCC 90028	
Cepa control para validar método de actividad hemolítica	
Control positivo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	
Control negativo: <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	

Cepas pertenecientes a la colección de hongos patógenos del LNR

Anexo 2: Puntos de corte recomendados en el documento M27- A3 del CLSI

Puntos de corte especie específicos del Fluconazol para *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*

Puntos de corte especie específicos del CLSI para el fluconazol (CMI en µg/mL)				
	Sensible	S-DD	Intermedio	Resistente
	Fluconazol			
<i>C. albicans</i>	≤ 2	4	-	≥ 4
<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	4	-	≥ 8
<i>C. tropicalis</i>	≤2	2	-	≥8

Leyenda: S-DD= Sensible dependiente de la dosis

Puntos de corte del Itraconazol según el CLSI para las diferentes especies de *Candida*, CLSI Documento M27 A-2

CMI del Itraconazol ((CMI en µg/mL)			
Sensible	S-DD	Intermedio	Resistente
≤ 0,12	0,25-0,5	-	≥ 1

Leyenda: S-DD= Sensible dependiente de la dosis