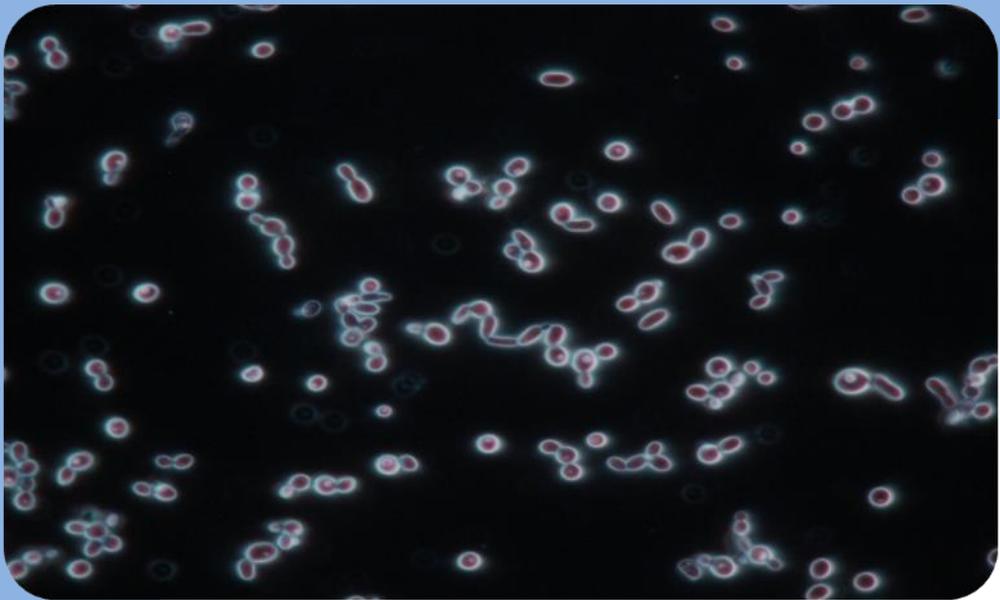


Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología

Diseño y utilidad de un protocolo de PCR múltiple mediante el análisis de regiones microsatélites para la diferenciación de aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto*



Tesis Doctoral

Camino Trobajo Sanmartín

Leioa, 2017

Índice

1. Introducción	1
1.1. Contexto epidemiológico de las infecciones fúngicas invasivas	3
1.1.1. Epidemiología básica de las infecciones fúngica invasivas	5
1.1.2. Distribución de especies de <i>Candida</i>	6
1.2. Complejo <i>Candida parapsilosis</i>	9
1.2.1. Generalidades	9
1.2.2. Epidemiología del complejo <i>Candida parapsilosis</i>	11
1.2.2.1. Epidemiología global	11
1.2.2.2. Epidemiología en España	12
1.2.3. Factores de virulencia	14
1.2.3.1. Adherencia	14
1.2.3.2. Producción de biopelículas	15
1.2.3.3. Cambio fenotípico	17
1.2.4. Factores de riesgo asociados al complejo <i>Candida parapsilosis</i>	17
1.2.4.1. Infecciones asociadas a catéteres u otros dispositivos biomédicos	19
1.3. Control de las infecciones	23
1.3.1. Infecciones nosocomiales e infecciones asociadas a la asistencia sanitaria	23
1.3.2. Brotes nosocomiales	23
1.3.3. Prevención de las infecciones nosocomiales	24
1.4. Sensibilidad a los fármacos antifúngicos	27
1.5. Diagnóstico de laboratorio	29
1.5.1. Métodos microbiológicos convencionales	29
1.5.2. Métodos moleculares	30
1.5.3. Técnicas de tipificación molecular	31
1.5.3.1. Microsatélites o <i>Short Tandem Repeats</i> (STR)	32
1.5.3.1.1. Clasificación de los STR	33
1.5.3.1.2. Mecanismos de mutación	33
1.5.3.1.3. Métodos de análisis de los STR	34

1.5.3.1.4. ¿Por qué usar los STR como marcador molecular para la tipificación molecular de <i>Candida parapsilosis</i>	37
1.5.4. La tipificación molecular en el estudio de brotes nosocomiales por <i>Candida parapsilosis</i>	39
2. Justificación y objetivos	43
2.1. Justificación	45
2.2. Objetivos	47
3. Materiales y métodos	49
3.1. Diseño del estudio	51
3.2. Metodología empleada para valorar la eficacia de un protocolo de PCR múltiple para la genotipificación mediante STR (Objetivos secundarios 1-4)	51
Tipo de estudio	51
Técnica de muestreo empleada	51
Cepas empleadas	52
Regiones microsatélites (<i>loci</i>) empleadas	52
Diseño experimental.....	54
a. Ensayos de optimización del conjunto de cebadores y componentes de la PCR.....	55
b. Ensayos para establecer diferencias en el efecto de la enzima polimerasa	58
c. Desarrollo del protocolo de amplificación <i>touchdown</i>	60
d. Valoración de la eficacia del nuevo protocolo	65
3.3. Estudios observacionales para verificar la efectividad y utilidad de la técnica propuesta (Objetivo 5)	69
Tipo de estudio	69
Técnica de muestreo empleada	69
Muestras empleadas	69
Diseño experimental.....	69
a. Procesamiento y cultivo de <i>Candida parapsilosis</i>	70
a.1. Procesamiento de las muestras.....	70
a.2. Cultivo y aislamiento de <i>Candida parapsilosis</i>	71
b. Identificación	72

b.1.. Identificación fenotípica del complejo <i>Candida parapsilosis</i> mediante pruebas bioquímicas.....	72
b.2.. Extracción y purificación del ADN	73
b.3. Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría	74
b.4. Identificación molecular de <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> , <i>Candida orthopsilosis</i> y <i>Candida metapsilosis</i>	75
Protocolo de amplificación.....	75
Condiciones de amplificación	75
Digestión de los productos de PCR.....	76
Electroforesis e interpretación de los resultados.....	76
Identificación mediante secuenciación	78
Protocolo de amplificación.....	78
Condiciones de amplificación	79
Electroforesis e interpretación de los resultados.....	79
d. Valoración de la efectividad de la nueva técnica	81
e. Análisis de la información contenida en las regiones analizadas para la tipificación molecular	83
3.4. Estudios observacionales para verificar la efectividad y utilidad de la técnica propuesta (Objetivo 6)	86
Tipo de estudio	86
Técnica de muestreo empleada	86
Muestras empleadas	86
Diseño experimental.....	86
b. Comparación y relación de los genotipos aislados en las diferentes Comunidades Autónomas	87
Producción de biopelículas.....	88
Sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos	89
4. Resultados	91
4.1. Valoración de la eficacia de un protocolo de PCR múltiple para la genotipificación mediante STR	93
a. Ensayos de optimización del conjunto de cebadores y componentes de la PCR	93

b. Ensayos para establecer diferencias en el efecto de la enzima polimerasa	94
c. Resultados tras la aplicación del protocolo de amplificación <i>touchdown</i>	99
d. Valoración de la eficacia del nuevo protocolo	106
4.2. Estudios observacionales para verificar la efectividad y utilidad de la técnica propuesta (Objetivo 5)	108
a y b. Procesamiento e identificación de las muestras.....	109
c. Genotipificación de aislamientos clínicos de <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> con el nuevo protocolo de PCR múltiple basado en PCR.....	110
Genotipos y relaciones filogenéticas.....	111
Relación entre genotipo, año y unidad hospitalaria de aislamiento.....	116
Infección mixta por <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> y <i>Candida orthopsilosis</i>	118
Producción de biopelículas.....	120
d. Valoración de la efectividad de la nueva técnica	124
e. Análisis de la información contenida en las regiones analizadas para la tipificación molecular	125
4.3. Estudios observacionales para verificar la efectividad y utilidad de la técnica propuesta (Objetivo 6)	127
a. Pacientes y aislamientos de <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i>	127
b. Comparación y relación de los genotipos aislados en las diferentes Comunidades Autónomas	132
Producción de biopelículas.....	138
Sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos	140
c. Análisis de la información contenida en las regiones analizadas para la tipificación molecular	142
5. Discusión	145
6. Conclusiones.....	161
7. Bibliografía	165
8. Material suplementario.....	183
8.1. Técnicas adicionales de análisis exploradas durante la estandarización	185
8.1.1. Análisis de sustracción Espectral de Señal	185
8.1.2. Resultados	186

Tabla 8.1. Resultados de identificación y genotipificación de los aislamientos clínicos del complejo <i>Candida parapsilosis</i> de hemocultivo y punta del catéter	2
8.2. Programación en el software R vers. 3.1.0 para el análisis de la información contenida en las regiones analizadas para la tipificación molecular.....	2
Tabla 8.2. Resultados de identificación y genotipificación de los aislamientos clínicos de <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> obtenidos del estudio FUNGEMYCA.....	2

Lista de abreviaturas o siglas

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micra
µM	Micromolar
55-TAMK	TAMRA-tetrametil-6-carboxirodamina
56-FAM	56-carboxi fluoresceína
5MAXN	Max 557 NHS Ester
5RhoR-XN	Rhodamina Red-X
A	Absorbancia a 260
AND	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ARC	Agar Rojo Congo
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Ban I	<i>Bacillus aneurinolyticus</i>
BHI	Infusión cerebro corazón
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA/ASB	Albúmina de suero bovino
CA	Comunidad autónoma
CCAA	Comunidades autónomas
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CIP	Cuidados intensivos pediátricos
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CRC	Candidemia relacionada a catéter
CVC	Catéter venoso central
DIV	Dispositivo intravascular
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
E	Especificidad
EEO	Electroendoósmosis
EEUU	Estados Unidos de América
EPINE	Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España
EICH	Enfermedad injerto contra huésped
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i>
FN	Falsos negativos

FP	Falsos positivos
FUNGEMYCA	<i>Spanish Fungemia Surveillance Multicentre Study</i>
FWD	<i>Forward</i>
h	Horas
h	Índice de homocigosidad
H (M)	Entropía
HET	Heterocigosidad
HETesp	Heterocigosidad esperada
HETobs	Heterocigosidad observada
IFFT	<i>Inverse Fast Fourier Transform</i>
IFI	Infección fúngica invasiva
IRC	Infección relacionada a catéter
ITS	<i>Internal Transcribed Spacers</i>
MALDI-TOF	Espectrofotometría de masas de desorción/ionización
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCPF	<i>National Collection of Pathogenic Fungal</i>
NCYC	<i>National Collection of Yeast Cultures</i>
nm	Nanómetro
NHSN	National Healthcare Safety Network
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	Poder de discriminación
PFGE	<u>Pulsed-field gel electrophoresis</u>
PIC	Contenido de información polimórfica
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
REA	Reanimación
Rep-PCR	<i>Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction</i>
REV	<i>Reverse</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RP-	Razón de probabilidad negativo
RP+	Razón de probabilidad positivo
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Sensibilidad
s	segundos
SADH	Deshidrogenasa alcohólica secundaria
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEIMC	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

SNR	<i>Signal to noise ratio</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
STRs	<i>Short Tandem Repeats</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampón tris-borato EDTA
TOS	TRasplante órgano sólido
TPH	Trasplante precursor hematopoyético
U. Tx.	Unidad de trasplante
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic</i>
UPV/EHU	Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VN	Verdaderos negativos
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
VP	Verdaderos positivos
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

Índice de tablas

Tabla 1.1. Factores de riesgo de candidemia en pacientes hospitalizados	19
Tabla 1.2. Recomendaciones para la prevención de las infecciones asociadas a catéteres	27
Tabla 1.3. Grupos principales de fármacos antifúngicos y su mecanismo de acción	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 1.4. Brotes de <i>Candida parapsilosis</i>	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 3.1. Regiones microsátélites incluidas en este estudio.	¡Error! Marcador no definido.53
Tabla 3.2. Cebadores empleados para amplificar los <i>loci</i> STR seleccionados.....	53
Tabla 3.3. Concentraciones y combinaciones de los <i>loci</i>	57
Tabla 3.4. Reacciones de PCR con cada una de las combinaciones de <i>Taq</i> polimerasa.	59
Tabla 3.5. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la prueba patrón	66
Tabla 3.6. Parámetros estadísticos empleados para determinar la validez y seguridad de métodos diagnósticos.....	67
Tabla 3.7. Valoración del índice Kappa.....	67
Tabla 3.8. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la prueba patrón	82
Tabla 3.9. Resumen de los parámetros estadísticos más comunes derivados de datos genotípicos.	85
Tabla 3.10. Puntos de corte clínicos establecidos para <i>Candida parapsilosis</i>	90
Tabla 4.1. Evaluación del efecto polimerasa en el protocolo de PCR múltiple.....	99
Tabla 4.2. Mezcla de la PCR múltiple.	¡Error! Marcador no definido.102
Tabla 4.3. . Protocolo de amplificación <i>touchdown</i> seleccionado.	103
Tabla 4.4. Estimación de la sensibilidad, especificidad, razones de probabilidad positiva y negativa de la prueba.	106
Tabla 4.5. Concordancia directa e índice Kappa entre ambos protocolos.	106
Tabla 4.6. Genotipos prevalentes en <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i>	112
Tabla 4.7. Pacientes en los que se observó infección mixta por <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> y <i>Candida orthopsilosis</i>	119
Tabla 4.8. Formación de biopelículas en ARC del complejo <i>Candida parapsilosis</i>	122
Tabla 4.9. Formación de biopelículas en cepas procedentes de hemocultivo y punta del catéter.	122
Tabla 4.10. Relación entre los genotipos y la producción de biopelícula.	123

Tabla 4.11. Estimación de la sensibilidad, especificidad, razones de probabilidad y valores predictivos de la genotipificación mediante el protocolo de PCR múltiple.	124
Tabla 4.12. Concordancia directa e índice Kappa entre ambos protocolos. ¡Error! Marcador no definido.5	
Tabla 4.13. Alelos obtenidos para cada uno de los <i>loci</i> estudiados.	125
Tabla 4.14. Resultados de los parámetros estadísticos que informan de la eficiencia de la técnica.....	126
Tabla 4.15. Distribución de las especies de <i>Candida parapsilosis sensu lato</i> por comunidad autónoma.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4.16. Distribución de las especies de <i>Candida parapsilosis sensu lato</i> en cada hospital.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4.17. Número de genotipos de <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> identificados en las diferentes comunidades autónomas.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4.18. Genotipos más prevalentes que estaban en diferentes comunidades autónomas.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 4.19. Genotipos (implicados únicamente dos aislamientos) que estaban en diferentes comunidades autónomas.....	134
Tabla 4.20. Producción de biopelículas en Agar rojo Congo.....	138
Tabla 4.21. Relación entre genotipos y producción de biopelículas.....	140
Tabla 4.22. Valores de CMI para cada una de las equinocandinas estudiadas de los aislamientos de <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> resistentes o dosis dependiente. ¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 4.23. Alelos obtenidos para cada uno de los <i>loci</i> estudiados. ¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 4.24. Parámetros estadísticos que informan de la eficiencia de la técnica STR.....	¡Error! Marcador no definido.43

Índice de Figuras

Figura 1.1. Distribución de especies de <i>Candida</i> diferentes a <i>Candida albicans</i> más frecuentes..	8
Figura 1.2. Distribución de las principales especies de <i>Candida</i> aisladas en las comunidades autónomas con mayor número de aislamientos, estudio FUNGEMYCA; Error! Marcador no definido.	
Figura 1.3. Etapas de la formación de biopelículas en <i>Candida albicans</i>	16
Figura 1.4. Eventos iniciales implicados en la contaminación directa de una vía venosa y generación posterior de una infección asociada a catéter	21
Figura 1.5. Recomendaciones para la prevención de las infecciones asociadas a catéteres	26
Figura 1.6. Regiones <i>Internal Transcribed Spacers</i> (ITS).....	31
Figura 1.7. Ejemplo de regiones STR.	36
Figura 3.1. Esquema de los ensayos realizados para la optimización de los cebadores.	55
Figura 3.2. Representación gráfica del desarrollo de la PCR múltiple.	56
Figura 3.3. Esquema de los protocolos de amplificación <i>touchdown</i> ensayados.	60
Figura 3.4. Protocolo <i>touchdown</i> 1.	61
Figura 3.5. Protocolo <i>touchdown</i> 2.	62
Figura 3.6. Protocolo <i>touchdown</i> 3.	62
Figura 3.7. Protocolo <i>touchdown</i> 4.	63
Figura 3.8. Esquema de la valoración de la eficacia del nuevo protocolo de PCR múltiple.	65
Figura 3.9. Crecimiento de ocho especies del género <i>Candida</i> en <i>Candida chromogenic agar</i> . .	71
Figura 3.10. Galería bioquímica ID 32 C con <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i>	73
Figura 3.11. Puntos de corte con la enzima <i>BanI</i> en amplicón <i>SADH</i>	77
Figura3.12. Método de identificación molecular por PCR-RFLP.....	77
Figura 3.13. Programa de análisis de secuencias Bioedit.	80
Figura 3.14. Imagen del algoritmo BLAST del NCBI	80
Figura 3.15. Esquema de valoración de la efectividad de la técnica empleando aislamientos clínicos.	81
Figura 3.16. Esquema de la valoración de las relaciones filogenéticas.....	87
Figura 3.17. Colonias con y sin capacidad productora de biopelículas en ARC.	89
Figura 4.1. Reacciones <i>singleplex</i> de los cuatro <i>loci</i> a diferentes concentraciones.	93
Figura 4.2. PCR múltiple con las cepas de referencia	94

Figura 4.3. PCR múltiples realizadas con la enzima <i>Taq</i> polimerasa TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version en 11 cepas genéticamente relacionadas con <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i>	95
Figura 4.4. PCR múltiple realizada con la enzima KAPA2G Fast Multiplex PCR kit en 11 cepas genéticamente relacionadas con <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i>	95
Figura 4.5. PCR múltiple realizada con la enzima TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version y la enzima KAPA2G Fast Multiplex PCR kit.	96
Figura 4.6. PCR múltiple realizada con la enzima AmpliTaq Gold® DNA Polymerase en 11 cepas genéticamente relacionadas con <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i>	97
Figura 4.7. Electroferogramas obtenidos con la enzima KAPA 2G Fast Multiplex PCR kit en comparación con AmpliTaq® Gold DNA	97
Figura 4.8. Detalle de la presencia de picos sombra.....	98
Figura 4.9. Protocolos <i>touchdown</i> 1, 2 y 3 con la enzima TaKaRa® Ex Taq Hot Start Version....	100
Figura 4.10. Protocolos <i>touchdown</i> 2 y 4 con la enzima KAPA 2G Fast Multiplex PCR kit	101
Figura 4.11. Protocolo <i>touchdown</i> 4, con la enzima TaKaRa® Ex Taq Hot Start Version y con la enzima KAPA 2G Fast Multiplex PCR kit.....	101
Figura 4.12. Protocolo <i>touchdown</i> 4, con la enzima AmpliTaq® Gold DNA Polymerase.	102
Figura 4.13. Electroferogramas correspondientes a los <i>locus</i> CP1 y CP4.	104
Figura 4.14. Electroferogramas correspondientes a los <i>locus</i> CP6 y B5	105
Figura 4.15. Distribución de los pacientes según los grupos de edad.	108
Figura 4.16. Distribución del número de casos de candidemia asociada a catéter debida a especies del complejo <i>Candida parapsilosis</i> según la unidad de ingreso.....	109
Figura 4.17. Aislamientos del complejo <i>Candida parapsilosis</i> estudiados.	110
Figura 4.18. Relaciones filogenéticas entre los aislamientos clínicos que conformaban el grupo o <i>cluster</i> A.....	113
Figura 4.19. Relaciones filogenéticas entre las cepas que conformaban el grupo o <i>cluster</i> B. ..	114
Figura 4.20. Relaciones filogenéticas entre las cepas de sangre y catéter.....	115
Figura 4.21. Relación entre los genotipos prevalentes y el año de aparición.....	117
Figura 4.22. Crecimiento en Agar rojo Congo.	121
Figura 4.23. Distribución de los aislamientos dentro de las especies del complejo <i>Candida parapsilosis</i>	128
Figura 4.24. Distribución del complejo <i>Candida parapsilosis</i> en cada comunidad autónoma. ..	129
Figura 4.25. Número de genotipos observados en las diferentes comunidades autónomas. ...	135

Figura 4.26. Distribución porcentual de los <i>clusters</i> (A1, A2 y C1) de genotipos más prevalentes por CCAA.	137
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------



INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Contexto epidemiológico de las infecciones fúngicas invasivas

Las infecciones fúngicas invasivas (IFI) se han convertido en un problema de relevancia creciente desde el inicio de la década de los 1980. En esos primeros años, se produjo un incremento generalizado de los casos de infección fúngica tanto invasiva como superficial. Estos casos estaban ligados fundamentalmente con la aparición de la infección por el VIH. Durante este periodo, las micosis invasivas más prevalentes en el mundo occidental fueron la candidiasis diseminada, la criptococosis meníngea o la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, estando todas ellas asociadas con el déficit de inmunidad celular provocado por la infección por el VIH. De hecho, una cuarta parte de las enfermedades definitorias de SIDA (incluidas en la categoría C de la clasificación de la infección por el VIH propuesta por los *Centers for Disease Control -CDC-* en 1993) son infecciones fúngicas y de ellas, un 33% están causadas por levaduras del género *Candida* (Castro et al., 1993; Hermoso et al., 2000). Afortunadamente, durante la década de los 1990, la disponibilidad clínica de nuevos fármacos antifúngicos, como el fluconazol, y la implantación y generalización de la triple terapia antirretroviral, supuso un cambio en la epidemiología descrita, al favorecer el control de la infección por el VIH y la disminución del número de casos de infecciones fúngicas, al menos en el mundo occidental, pero quedando aún hoy en día un largo camino por recorrer en los países con menos recursos económicos.

A pesar de los avances descritos, a finales de la década de los 1990 se observó un nuevo giro epidemiológico en la dinámica de las IFI. La mejora de las técnicas en los procedimientos médicos y quirúrgicos asociados a los trasplantes (de órgano sólido -TOS- o de precursores hematopoyéticos -TPH-) junto con el uso de fármacos inmunosupresores empleados para evitar el rechazo y la enfermedad injerto contra huésped (EICH), con una posología óptima y con menores efectos adversos e interacciones farmacológicas, permitieron incrementar la supervivencia de los pacientes receptores de trasplantes. Sin embargo, también supuso un aumento del número absoluto de IFI que comenzaron a ser un problema clínico añadido importante en el manejo de estos pacientes. Este hecho auspició una revolución en la

terapia antifúngica existente hasta el momento con la aparición de nuevos triazoles (posaconazol y voriconazol), la mejora de algunos fármacos antifúngicos existentes (anfotericina B liposómica) o el descubrimiento de nuevas familias terapéuticas, como las equinocandinas (anidulafungina, caspofungina y micafungina). El desarrollo y la puesta en marcha de todos estos hitos han tenido una gran relevancia en el arsenal antifúngico y las guías terapéuticas actuales de las IFI (Aguado et al., 2011; Pappas et al., 2016a).

En resumen, seguimos teniendo pacientes con un déficit en la inmunidad celular en los cuales se constata un aumento de las IFI. Sin embargo, hay al menos tres diferencias importantes con respecto a la situación observada en el paciente infectado con el VIH:

1. La inmunodepresión en este tipo de pacientes se mantiene, en mayor o menor grado de por vida ya que de lo contrario el paciente perdería la funcionalidad del órgano trasplantado por rechazo.
2. Este riesgo mantenido conlleva el uso de medidas profilaxis antifúngica por un tiempo variable, pero habitualmente prolongado, en aquellos pacientes con una inmunidad celular deficiente.
3. El uso de profilaxis antifúngica mantenida favorece en los aislamientos clínicos la aparición de resistencias a los fármacos antifúngicos.

Es por esto, que en diversas instituciones sanitarias exista una preocupación creciente por las IFI motivado no sólo por el aumento significativo del número de casos de infecciones del torrente sanguíneo causadas por hongos (fungemias), sino también por la constatación de un aumento paulatino de las resistencias a los fármacos antifúngicos y la aparición de especies multirresistentes como *Candida auris* (Arendrup et al., 2008; Ruiz Gaitán et al., 2017; Tortorano et al., 2013). Por si esto fuera poco, el incremento descrito no puede atribuirse sólo a la mayor probabilidad de supervivencia de los pacientes graves, sino al aumento de factores de riesgo tanto intrínsecos como extrínsecos asociados a la práctica clínica actual, que causan un aumento de esta manera tanto el número de pacientes en riesgo de desarrollar una infección, como en el número de los que después de superar una infección bacteriana puedan desarrollar una micosis invasiva (Chow et al., 2008; Hammoudetal., 2013; Luzzati et al., 2016).

1.1.1 Epidemiología básica de las infecciones fúngicas invasivas

Los microorganismos más frecuentemente implicados en las IFI, pertenecen a los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* y *Aspergillus*, siendo la candidiasis invasiva la más frecuente con una incidencia mundial estimada de más de 250.000 personas/año y una tasa de mortalidad global aproximada del 20% (Kullberg & Arendrup, 2015).

De entre las diversas presentaciones clínicas registradas en las infecciones invasivas por levaduras del género *Candida*, la más común es la infección del torrente sanguíneo (candidemia). Paralelamente a lo descrito anteriormente, la incidencia de candidemia también ha ido en aumento desde la década de los 1980, siendo considerada la cuarta causa de infección del torrente sanguíneo en el medio hospitalario, por detrás de las bacteriemias provocadas por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Grupo de estudio EPINE, 2017; Quindós, 2014).

Desde un punto de vista epidemiológico, las candidiasis invasivas suelen ser infecciones asociadas a la asistencia sanitaria o nosocomiales, aunque existen situaciones (como la aparición de una fungemia secundaria a la perforación de una víscera hueca abdominal por traumatismo u otra causa) en las cuales, dichas infecciones pueden ser consideradas infecciones comunitarias. Por ello, es importante considerar los antecedentes personales, la historia clínica y los procedimientos realizados a cada paciente que sufre una IFI. La subdivisión de las infecciones según su origen en nosocomial, cuando el inicio de la infección tiene lugar 72 horas después de la hospitalización, o comunitarias, cuando la infección comienza antes de los dos días de ingreso, carece de sentido práctico sin un examen cuidadoso de la historia clínica y de las circunstancias relacionadas con la aparición y/o el desarrollo de la infección. Así, por ejemplo, un paciente intervenido de un procedimiento de cirugía colorrectal puede acudir tras recibir el alta a un centro sanitario con una infección invasiva por *Candida* motivada por una dehiscencia de una sutura del procedimiento anterior. En este caso, y aunque la infección esté presente al ingreso, esta será etiquetada como infección nosocomial siempre y cuando no hayan transcurrido más de 30 días desde el día de la intervención quirúrgica. Si además, tenemos en cuenta que la cirugía abdominal es un factor de riesgo asociado al desarrollo de una IFI por *Candida*, este caso pone de

manifiesto la relevancia epidemiológica de la revisión cuidadosa de la historia clínica del paciente antes de catalogar el origen de una infección fúngica invasiva como comunitaria o nosocomial (Horn et al., 2009; Pfaller MA & Diekema DJ, 2012).

Por último, cabe señalar que la incidencia de candidemia puede variar no sólo según el tipo de área de hospitalización o las características del paciente, sino que también puede hacerlo en función de la localización geográfica y la población de estudio. La incidencia de candidemia registrada en Australia, Canadá, Europa y América Latina es significativamente menor que la observada en EEUU, donde se han descrito incidencias de entre 6 y 10 casos por 100.000 habitantes. En los Países Nórdicos se han reportado incidencias de 1,4-5,7 casos por 100.000 habitantes, en Canadá del 2,9 y en Australia de 1,8 casos por 100.000 habitantes. En los estudios realizados en otros países europeos, las incidencias oscilan entre los 1,4 y los 5,7 casos por 100.000 habitantes. Sin embargo, dos países, Dinamarca y España, representan excepciones en Europa porque las incidencias observadas de candidemia han sido más alta que las registradas en el resto de los países europeos (Quindós, 2014). Arendrup y colaboradores publicaron un estudio realizado en Dinamarca durante los años 2004-2009 con una incidencia estimada de 8,6 casos de candidemia por 100.000 habitantes, mientras que en el estudio multicéntrico realizado en España durante 2010-2011 por Almirante y colaboradores (2013) se mostró una incidencia de 8,14 casos por cada 100.000 habitantes (B. Almirante, 2013; Arendrup et al., 2008; Quindós, 2014).

1.1.2. Distribución de especies de *Candida*

Hay descritas más de 100 especies distintas de *Candida*; sin embargo, entre el 95 y el 97% de los episodios de candidiasis invasivas son causados por cinco especies: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* (Pemán & Salavert, 2013).

Candida albicans sigue siendo la especie más común y es responsable de un 40-70% de los episodios de candidemia e IFI, en función del servicio clínico de ingreso y las características clínicas, antecedentes personales y procedimientos realizados al paciente hospitalizado que desarrolla la infección (Guinea, 2014; Pfaller & Diekema, 2007).

Sin embargo, la frecuencia de aislamientos clínicos de las especies de *Candida* causantes de candidiasis invasiva está en continuo cambio debido, principalmente, a la variabilidad geográfica en su distribución, por lo que, es muy importante el conocimiento de la etiología local y la asociación con determinadas unidades y servicios hospitalarios de las mismas. En la última década, estudios realizados en diferentes regiones geográficas, mostraron cambios epidemiológicos con mayor frecuencia en la distribución de las especies que causan candidiasis, con una disminución de incidencia de las candidiasis causadas por *Candida albicans* y por el contrario un incremento de las candidiasis causadas por especies diferentes de *Candida albicans* (Benito Almirante et al., 2005; Pfaller, 2005; Pfaller & Diekema, 2007; Tortorano et al., 2013)

En países de América del Norte, como Canadá y EEUU, del centro y norte de Europa, como Alemania, Austria y Suecia, *Candida glabrata* es la segunda especie más común que causa candidiasis, por detrás de *Candida albicans*. Mientras que, en el Sur de Europa, Asia y Sur de América, *Candida parapsilosis* es la especie predominante después de *Candida albicans* (Figura 1.1) (Kullberg & Arendrup, 2015; Quindós, 2014). Esta diferencia en la etiología de las candidiasis invasivas es un factor de vital importancia para establecer el diagnóstico correcto y el tratamiento adecuado de estas infecciones. Las características fisiológicas y propias de estas especies demoran el diagnóstico y la potencial resistencia a los fármacos antifúngicos empeora el diagnóstico al retrasar la instauración de la terapia más intensa (Pappas et al., 2016; Pfaller, 2005).



Figura 1.1. Distribución geográfica de las especies de *Candida* diferentes a *Candida albicans* más frecuentes (Quindós, 2014).

Además del área geográfica, el tipo de paciente, así como sus características clínicas también son factores que influyen en la distribución y frecuencia de aislamiento de especies del género *Candida*. *Candida albicans* es más frecuente en pacientes mayores de 18 años, pero también se ha observado que la incidencia relativa de *Candida parapsilosis* es mayor en los pacientes pediátricos (disminuyendo con la edad) y que *Candida glabrata* es más común en pacientes con edades avanzadas (Quindós, 2015).

Existen otros factores de riesgo que se asocian con la aparición de un episodio de candidemia, aunque muchos están en discusión por ser controvertidos, ya que pueden ser posibles variables de confusión en el desarrollo de una candidemia al estar asociadas a otras variables y al efecto. Este es el caso de la influencia del uso de determinados antibióticos, algunas enfermedades de base o determinados procesos invasivos en el desarrollo de candidemias por especies concretas, existiendo datos dispares en la literatura científica. Así por ejemplo, se ha asociado el uso previo de vancomicina y otros fármacos con candidemias por *Candida glabrata* y *Candida krusei* (Lin et al., 2005), la diabetes con *Candida tropicalis* y la cirugía torácica y abdominal con *Candida guilliermondii* (Hajjeh et al., 2004; Kao et al., 1999).

Por último, cabe resaltar que *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* predominan en las candidemias en neonatos y lactantes, sobre todo en los recién nacidos con bajo peso ingresados en la UCI neonatales. De hecho, en un estudio reciente en España en pacientes pediátricos, se observó un alto porcentaje de casos de candidemia por *Candida parapsilosis* (46,5%) situándose por delante de *Candida albicans* (36,5%) (Pemán, Cantón, Linares-Sicilia, et al., 2011). Así mismo, ambas especies causan candidemias relacionadas con el uso de dispositivos biomédicos y/o la administración de nutrición parenteral (Guinea, 2014), hechos que, aunados a las circunstancias epidemiológicas anteriores, explican el interés generado en torno al diagnóstico, tratamiento y control de las infecciones provocadas por estas dos especies.

1.2. Complejo *Candida parapsilosis*

1.2.1. Generalidades

Candida parapsilosis es un hongo levaduriforme aislado por primera vez en Puerto Rico en 1928 por Ashford a partir de las heces de un paciente con diarrea (Benito Almirante et al., 2006; Ashford B, 1928; Weems, 1992). En un principio se clasificó taxonómicamente como una especie de *Monilia*, incapaz de fermentar la maltosa, a la que se denominó *Monilia parapsilosis* para distinguirla de la especie más frecuente, *Monilia psilosis*, nombre con el que inicialmente se denominó a la especie *Candida albicans* (Trofa et al., 2008).

Las células de *Candida parapsilosis* pueden presentar formas diversas (ovaladas, redondas o incluso cilíndricas) con un tamaño que oscila entre 2,5-4 μm x 2,5-9 μm . Las colonias típicas adquieren un color blanco, cremoso y de aspecto brillante en agar glucosado de Sabouraud, mientras que el borde puede ser tanto liso como rugoso (Trofa et al., 2008). A diferencia de otras especies, como *Candida albicans* o *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* no forma hifas verdaderas, pero sí puede presentar tanto una fase de levadura como de pseudohifa (Enger et al., 2001; Laffey & Butler, 2005). Existen evidencias de que éstas pseudohifas se encuentran vinculadas a un conjunto específico de aminoácidos, que parece ser responsable de originar cambios importantes en su morfología celular (Kim et al., 2006; Treviño-Rangel et al., 2012), lo que permite que *Candida parapsilosis* pueda adoptar diferentes fenotipos,

exhibiendo colonias lisas/crateriformes o bien colonias con forma de crepé o concéntrica, según se traten de levaduras o de pseudohifas, respectivamente (Trofa et al., 2008). *Candida parapsilosis* es capaz de crecer sobre sustratos minerales que contengan fuentes de carbono, como la glucosa u otros carbohidratos, nitrógeno, fosfato y azufre. Sin embargo es incapaz de asimilar y fermentar la lactosa, lo que puede servir de ayuda para facilitar la identificación inequívoca de la especie en el laboratorio (Silva et al., 2011).

En la taxonomía fúngica actual, se considera que *Candida parapsilosis* se trata en realidad de un complejo de tres especies genéticamente relacionadas. Esta afirmación se sustenta en una serie de ensayos moleculares que se resumen a continuación.

En 1987, Scherer y Stevens propusieron la aplicación de la técnica molecular *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) para el análisis genético de aislamientos clínicos de levaduras del género *Candida* y su posible aplicación al estudio taxonómico y epidemiológico de distintas especies. En los estudios realizados con esta técnica, se descubrieron tres patrones de restricción diferentes para la especie *Candida parapsilosis*, por lo que se sugirió que esta especie poseía una elevada variabilidad genética (Scherer & Stevens, 1988).

Posteriormente, en 1992, Lehmann y colaboradores emplearon la técnica *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) y al igual que Scherer y Stevens (Scherer & Stevens, 1988) encontraron tres patrones de bandas diferentes, que fueron clasificados como tres grupos diferentes dentro de una misma especie (*Candida parapsilosis* grupo I, *Candida parapsilosis* grupo II y *Candida parapsilosis* grupo III) (Lehmann et al., 1992). Estos grupos genéticos dentro de *Candida parapsilosis* se asociaban con determinadas características patógenas y asociaciones clínicas (Cassone et al., 1995)

En 1998, Roy y Meyer basándose en estudios de homología del ADN y en base a los patrones de restricción observados en estudios anteriores, confirmaron la existencia de tres genotipos diferentes de *Candida parapsilosis* probablemente relacionados, que podrían considerar especies (Roy & Meyer, 1998). Fue en el año 2005, cuando se llevó a cabo una reclasificación, ya que se observó que el complejo a pesar de ser fenotípicamente idéntico

poseía diferencias genotípicas relevantes. De manera que el grupo I paso a denominarse *Candida parapsilosis sensu stricto* y los aislamientos que pertenecían a los grupos II y III pasaron a llamarse *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* respectivamente (Tavanti et al., 2005).

1.2.2. Epidemiología del complejo *Candida parapsilosis*

Candida parapsilosis es un microorganismo ubicuo en el medio ambiente natural, se encuentra habitualmente como comensal en la piel y las mucosas de los seres humanos, pero su hábitat a diferencia de otras especies del género *Candida*, no está restringido exclusivamente como patógeno humano obligado, ya que se ha aislado también de animales domésticos, insectos o de diversos hábitats como el suelo y los ambientes marinos (Trofa et al., 2008; van Asbeck et al., 2009).

Estudios recientes reflejan que de las tres especies descritas incluidas en el complejo *Candida parapsilosis*, la especie *Candida parapsilosis sensu stricto* es la más comúnmente aislada de candidemias producidas por este complejo, con porcentajes que oscilan entre el 75 y el 98% (Garcia-Effron et al., 2012; Miranda-Zapico et al., 2011), mientras que *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* son mucho menos frecuentes, con porcentajes entre el 1,4-23.5% (Blanco-Blanco et al., 2014; Garcia-Effron et al., 2012) y el 0,8-5,6% respectivamente (Chen et al., 2010; Miranda-Zapico et al., 2011).

1.2.2.1. Epidemiología global

Desde 1990 *Candida parapsilosis* ha mostrado un incremento paulatino en su incidencia pasando a ser en muchos países la segunda especie más frecuente en infecciones del torrente sanguíneo. Según datos del *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program* de 2003, *Candida parapsilosis* fue la segunda especie más aislada en pacientes hospitalizados. En América del Norte supuso el 15,5% de los aislamientos, el 16,3% en Europa y el 23,4% en América Latina. Estos porcentajes sólo fueron superados por *Candida albicans* (51,5%, 47,8% y 36,5%, respectivamente) y únicamente por *Candida glabrata* en América del Norte (21,3%) (Messer et al., 2006; Trofa et al., 2008).

En cuanto a las otras dos especies nuevas, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*, Lockart y colaboradores (2008) realizaron un estudio con cepas pertenecientes al *ARTEMIS Global Surveillance Study* en el cual observaron una prevalencia del 6,1% para *Candida orthopsilosis* y del 1,8% para *Candida metapsilosis*; sin embargo, esta prevalencia variaba en función de la región estudiada. El porcentaje de *Candida orthopsilosis* aumentó de forma global de un 4,5% en 2001-2004 a un 8,3% en los años 2005 y 2006 (Lockhart, Messer, Pfaller, & Diekema, 2008; Pfaller & Diekema, 2012). Estos datos contrastan con los referidos por Tay y colaboradores (2009) en un estudio realizado en Malasia durante 2004-2007 en el que observaron prevalencias superiores a las descritas tanto para *Candida orthopsilosis* (23,8%) como para *Candida metapsilosis* (4,8%), poniendo de manifiesto que la epidemiología de las especies del género *Candida* en general y del complejo *Candida parapsilosis* en particular, varían según la localización geográfica (Miranda-Zapico et al., 2011; Tay et al., 2009).

No obstante, conviene destacar que con respecto a las especies crípticas pertenecientes al complejo *Candida parapsilosis*, en la literatura científica hay muy pocos datos acerca de su distribución, así como de su sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos (Cantón et al., 2011; Lockhart et al., 2008; Miranda-Zapico et al., 2011; Tay et al., 2009)

1.2.2.2. Epidemiología en España

En el estudio transversal multicéntrico FUNGEMYCA acerca de la epidemiología de la candidiasis invasora y la sensibilidad a los fármacos antifúngicos realizado en España durante los años 2009 y 2010, en el que participaron 43 centros hospitalarios, *Candida albicans* fue la especie predominante (44,7%), seguida de *Candida parapsilosis* (26,6%), *Candida glabrata* (11,5%), *Candida tropicalis* (8,2%), *Candida orthopsilosis* (2,2%) y *Candida krusei* (2%). Llama la atención que la incidencia de *Candida orthopsilosis* superó a la de *Candida krusei*. Teniendo en cuenta los datos mencionados en el apartado anterior, la distribución de las especies aisladas reveló diferencias sustanciales tanto por Comunidades Autónomas (CCAA) (Figura 1.2) como según el hospital estudiado. *Candida parapsilosis* se aisló de manera más notable en la Comunidad Valenciana (con una prevalencia del 40%) y con una prevalencia sensiblemente inferior en Cataluña (12%), difiriendo ambas de manera

estadísticamente significativa de la prevalencia media estimada para el conjunto del Estado (29%). El análisis de la distribución de las especies en función de la unidad de hospitalización determinó que *Candida parapsilosis* fue la especie predominante en los servicios de neonatología (46%) y de pediatría general (59%) (Pemán, Cantón, Linares-Sicilia, et al., 2011; Pemán & Salavert, 2013).

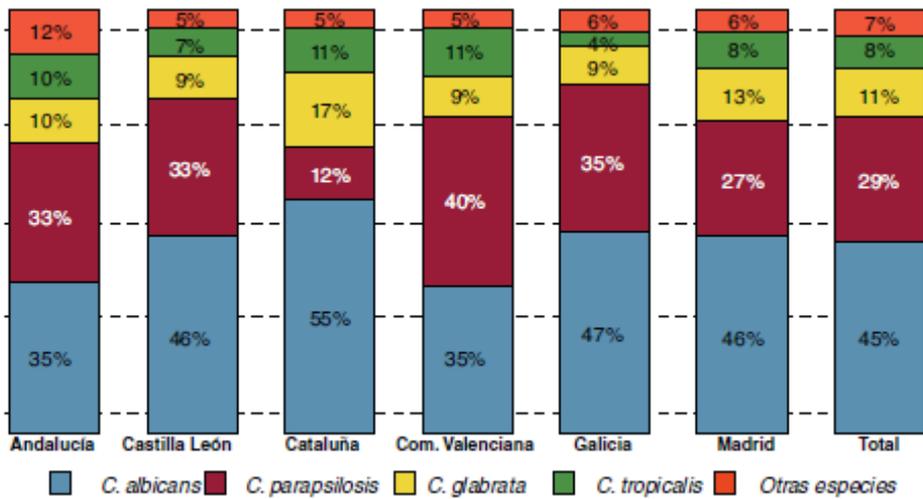


Figura 1.2. Distribución de las principales especies de *Candida* aisladas en las comunidades autónomas con mayor número de aislamientos, estudio FUNGEMYCA (Pemán & Salavert, 2013).

En el estudio prospectivo poblacional sobre candidemia (CANDIPOP), realizado en España entre los años 2010 y 2011 y en el que participaron un total de 29 hospitales, se describieron datos similares a los observados en el estudio FUNGEMYCA. *Candida albicans* (45,4%) continuó siendo la especie más prevalente seguida de *Candida parapsilosis* (24,9%), *Candida glabrata* (13,4%), *Candida tropicalis* (7,7%) y *Candida krusei* (2%) (Puig-Asensio et al., 2013).

En el estudio realizado en Barcelona durante 2002 y 2003 por Gómez-López y colaboradores (2008), se estimó una prevalencia de *Candida orthopsilosis* del 1,4%, mientras que sorprendentemente la prevalencia observada de *Candida metapsilosis* fue un poco superior

(1,7%). Otros estudios han revelado una epidemiología variable con el tiempo, como por ejemplo en el estudio realizado en Cádiz durante 2007-2009 por Blanco-Blanco y colaboradores (2012) se obtuvo una prevalencia del 11,5% para *Candida orthopsilosis* mientras que no se identificó ningún aislamiento de *Candida metapsilosis*. Por su parte, Garcia-Effron y colaboradores (2012) en el estudio realizado en el Hospital Universitario y Politécnico de la Fe de Valencia entre 1995 y 2007, determinaron una prevalencia del 23,54% para *Candida orthopsilosis* y un 2,05% correspondió a *Candida metapsilosis*. Por último, cabe destacar que en todos los estudios citados anteriormente, los aislamientos correspondientes a *Candida orthopsilosis* correspondieron principalmente a pacientes neonatos y pediátricos ingresados en la UCI (Blanco-Blanco et al., 2014; Garcia-Effron et al., 2012; Gomez-Lopez et al., 2008).

1.2.3. Factores de virulencia

La patogénesis de la infección producida por *Candida parapsilosis* se fundamenta en la participación coordinada de diversos factores de virulencia de este microorganismo. De entre todos los factores descritos, la adherencia a las células del hospedador, su capacidad para formar biopelículas y la secreción de ciertas enzimas hidrolíticas junto con la capacidad para transformarse de fase levaduriforme a pseudohifa («cambio fenotípico») son los que desempeñan los papeles más relevantes en la patogénesis (Trofa et al., 2008; van Asbeck et al., 2009). Estos factores han sido investigados ampliamente en *Candida albicans*; sin embargo, su conocimiento y caracterización en el complejo *Candida parapsilosis* es prácticamente desconocido (Trofa et al., 2008).

1.2.3.1. Adherencia

Uno de los factores de virulencia vinculados a la colonización e infección por *Candida parapsilosis* del microorganismo es su capacidad para adherirse a las células y tejidos del hospedador, particularmente a las superficies mucosas. Además, el complejo *Candida parapsilosis* tiene la capacidad para adherirse a la superficie de los dispositivos biomédicos facilitando su colonización, así como la formación de biopelículas, constituyendo de esta manera un factor fundamental para la persistencia de la infección y favoreciendo la

aparición de candidiasis invasiva de brecha (Del Pozo & Cantón, 2016; Trofa et al., 2008). La hidrofobicidad de la superficie celular se ha asociado con la adherencia inicial de *Candida parapsilosis* a las superficies abióticas (van Asbeck et al., 2009), así como la producción de biopelículas se ha relacionado con la tendencia del microorganismo a adherirse de forma persistente a catéteres biomédicos (Branchini et al., 1994).

1.2.3.2. Producción de biopelículas

Las biopelículas son comunidades de microorganismos adheridos a una superficie que están a su vez, embebidos en una matriz extracelular producida por el propio microorganismo. Este tipo de crecimiento en comunidades microbianas es el más prevalente de los crecimientos microbianos en la naturaleza (Kuhn et al., 2002).

La mayoría de los estudios sobre la formación de biopelículas se han efectuado con *Candida albicans*. En esta especie se ha asociado su formación con el cambio dimorfo de levadura a hifa. La estructura de las biopelículas producidas por *Candida albicans* muestran dos capas celulares distintas: una capa basal fina, constituida esencialmente por levaduras, y una segunda capa más gruesa y menos compacta formada por hifas (Baillie & Douglas, 1999). Como ya se ha mencionado con anterioridad, *Candida parapsilosis* no produce hifas verdaderas por lo que genera cuantitativamente menos biopelícula y esta posee una menor complejidad que las biopelículas de *Candida albicans*. Sin embargo, se ha observado que ciertos fenotipos filamentosos de *Candida parapsilosis* son capaces de generar más biopelícula y son más invasivos en agar que otras cepas que permanecen en fase levaduriforme de forma permanente (Figura 1.3) (Laffey & Butler, 2005).

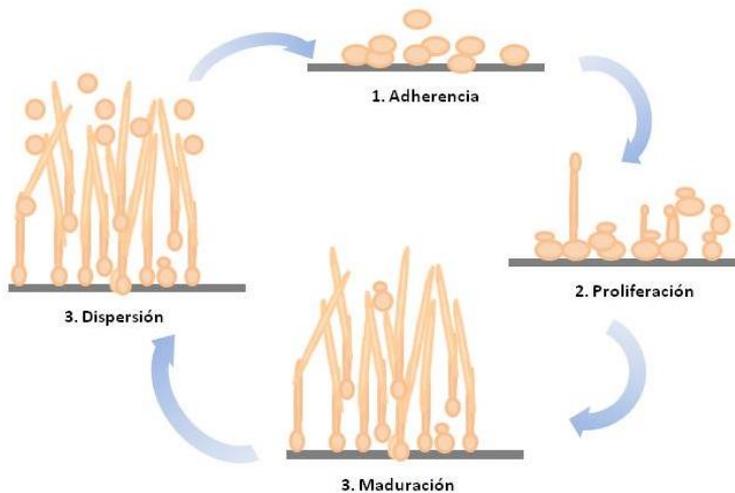


Figura 1.3. Etapas de la formación de biopelículas en *Candida albicans* (Modificado de Nobile & Johnson, 2015).

Las biopelículas de *Candida parapsilosis* pueden formarse sobre diversos dispositivos biomédicos, incluyendo catéteres, válvulas protésicas y prótesis articulares (Ramage et al., 2006). Algunos aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis* con gran capacidad de producir biopelículas se han asociado con la aparición de brotes nosocomiales (Kuhn et al., 2004). No obstante, conviene señalar que siempre, con independencia del material o de la capacidad para formar biopelícula, la formación de la misma se encuentra precedida por la adherencia a tejidos o dispositivos biomédicos, que tienen como resultado un cambio en la morfología y comportamiento del microorganismo (Trofa et al., 2008).

Las biopelículas son un factor de virulencia importante para varias especies de *Candida*, ya que limita la penetración de los fármacos antifúngicos a través de la matriz, confiriendo una resistencia a la terapia, además de servir de protección frente a la respuesta inmune del hospedador. La diferencia exhibida por diferentes aislamientos de *Candida parapsilosis* para causar lesiones en distintos tejidos parece estar influenciada por la habilidad del aislamiento concreto para formar biopelículas. Dentro de las especies de *Candida*, *Candida parapsilosis* es la que presenta una mayor variabilidad, dentro de la especie, en producción de

biopelícula, y también muestra un amplio abanico en las presentaciones clínicas de las infecciones que causa (Del Pozo & Cantón, 2016; Trofa et al., 2008).

De hecho, Song y colaboradores (2005) constataron que *Candida parapsilosis sensu stricto* era la única especie del complejo capaz de producir biopelículas. Sin embargo, un estudio más reciente de Lattif y colaboradores (2010) evidenció que tanto *Candida orthopsilosis* como *Candida metapsilosis* son también capaces de producirlas y que la topografía de la superficie de las biopelículas generadas por las tres especies del complejo es muy similar y se encuentra conformada por conglomerados de levaduras dispuestos irregularmente (Lattif et al., 2010; Song et al., 2005; van Asbeck et al., 2009).

1.2.3.3. Cambio fenotípico

El «cambio fenotípico» es un fenómeno de inestabilidad fenotípica específica, que permite a las cepas cambiar su morfología sin afectar a su genotipo, y aunque se ha estudiado ampliamente en *Candida albicans*, también se ha observado en *Candida parapsilosis* (Enger et al., 2001; Lockhart et al., 2008). Laffey y Butler (2005) encontraron que existe cierta correlación entre el cambio fenotípico y la formación de biopelículas, pero los mecanismos moleculares que regulan este cambio en *Candida parapsilosis* aún se desconocen (Laffey & Butler, 2005; van Asbeck et al., 2009).

1.2.4. Factores de riesgo asociados al complejo *Candida parapsilosis*

Además de los distintos factores de virulencia ya descritos, la mayoría de las infecciones causadas por el complejo *Candida parapsilosis* pueden ocurrir sin colonización previa de las superficies mucosas o de la piel, siendo frecuente su transmisión horizontal a través de fuentes externas contaminadas, sean éstas inanimadas o no (Trofa et al., 2008). Diversos factores entre los que se incluyen) la capacidad selectiva del microorganismo de crecer en soluciones ricas en glucosa (como las empleadas para la nutrición parenteral), su habilidad para crecer y formar biopelículas en catéteres y otros dispositivos biomédicos., la producción y secreción de proteinasas aspárticas, su capacidad de diseminación nosocomial (principalmente a través de las manos del personal sanitario) y la capacidad de persistir en

el ambiente hospitalario, justifican el incremento registrado durante las últimas décadas de las infecciones debidas a este complejo (Delfino et al., 2014; Magobo et al., 2017).

Los pacientes con enfermedades graves de base presentan un mayor riesgo de padecer IFI y con las especies del complejo *Candida parapsilosis* no habitualmente se produce una excepción. Aquellos pacientes con inmunodeficiencias importantes, como los receptores de trasplantes, los que están infectados por el VIH, padecen cáncer o han sido sometidos recientemente a una intervención quirúrgica (sobre todo del tracto gastrointestinal) tienen un riesgo más elevado de sufrir una infección por este complejo de especies. Además, aquellos pacientes con otros factores de riesgo extrínsecos tales como catéteres venosos centrales o algún otro tipo de dispositivos intravasculares que permanezca durante un tiempo prolongado en el cuerpo, tienen un incremento adicional de riesgo de sufrir una infección invasiva por *Candida parapsilosis* (Trofa et al., 2008). No obstante, la población más vulnerable para sufrir una infección nosocomial por dicho complejo, son los neonatos con bajo peso. La colonización de la piel o el tracto gastrointestinal suele ser la primera etapa de la infección por *Candida*. Los neonatos de bajo peso son especialmente propensos a la infección por especies del complejo *Candida parapsilosis* debido a la integridad alterada de su piel, además de una mayor permeabilidad a los microorganismos del tracto gastrointestinal y la necesidad del uso prolongado de dispositivos invasivos tales como catéteres o intubación endotraqueal que los predispone a la colonización. Así mismo, diversos trabajos han reflejado que el 23% de los neonatos sanos estaba colonizado por *Candida parapsilosis* en la mucosa orofaríngea, mientras que esta misma especie fue aislada de aproximadamente un tercio de los neonatos con colonización gastrointestinal por especies del género *Candida* (Contreras et al., 1994; Saiman et al., 2001).

Diversos estudios también han reportado que las manos del personal sanitario son uno de los principales vectores en la adquisición exógena de *Candida parapsilosis*. Como un comensal normal de la piel humana, este microorganismo plantea una grave amenaza para aquellos pacientes que interactúan con el personal sanitario colonizado, particularmente cuando se viola el protocolo estándar para la higiene apropiada de las manos (Delfino et al., 2014; Trofa et al., 2008). Aunque los porcentajes varían entre los estudios realizados,

múltiples trabajos han descrito que *Candida parapsilosis* es la levadura del género *Candida* más comúnmente aislada a partir de las manos de dicho personal (Delfino et al., 2014; Kuhn et al., 2004; van Asbeck et al., 2007; van Asbeck et al., 2009).

En la Tabla 1.1 se muestran los principales factores de riesgo asociados con candidemia en pacientes hospitalizados.

Tabla 1.1. Factores de riesgo de candidemia en pacientes hospitalizados (Modificado de Pfaller & Diekema, 2012).

Factor de riesgo	Posible papel en la infección
Agentes antimicrobianos (uso prolongado)	Promueven el acceso vascular y promueven la colonización
Edad (< 1 año, > 70 años)	Inmunosupresión
Enfermedades subyacentes	Inmunosupresión Procedimientos invasivos
Colonización previa	Translocación a través de la mucosa
Catéteres intravasculares permanentes (CVC)	Acceso vascular directo Contaminación
Nutrición parenteral	Acceso vascular directo Hiperglucemia Contaminación de los fluidos administrados
Cirugía gastrointestinal	Ruta de infección Disrupción de la mucosa Acceso vascular directo
Ventilación mecánica	Ruta de infección
Estancias hospitalarias (UCI)	Exposición a los microorganismos patógenos Mayor exposición a factores de riesgo
Quimioterapia	Inmunosupresión Disrupción de la mucosa

1.2.4.1. Infecciones asociadas a catéteres y otros dispositivos biomédicos

La infección asociada a catéteres intravasculares centrales (CVC) es una causa frecuente de candidemia. En el estudio EPINE de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España realizado anualmente, se estimó que cerca del 50% de los pacientes hospitalizados son portadores de un catéter vascular en algún momento de su estancia hospitalaria, y que la prevalencia de la bacteriemia asociada a su uso oscila entre 2,5 y 3,4 episodios por cada 1000 pacientes ingresados. Generalmente, los microorganismos que producen con mayor

frecuencia infecciones asociadas a CVC son comensales habituales de la piel, como es el caso de estafilococos coagulasa negativos, algunas enterobacterias o el género *Enterococcus* (Grupo de estudio EPINE, 2017). Sin embargo, en los últimos años se ha observado un notable incremento de las infecciones asociadas a CVC producidas por levaduras del género *Candida*, principalmente *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* (Aguado et al., 2011; Bouza E, Liñares J, Pascual, 2004). No obstante, existen pocos estudios relacionados con la epidemiología de las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos por parte de especies de *Candida* diferente de *Candida albicans*, así como la existencia de biopelículas en este tipo de infecciones (frecuente en estas especies) y su posible asociación con la cronicidad de las mismas que en muchas ocasiones obliga al reemplazamiento de los dispositivos (Del Pozo & Cantón, 2016).

Actualmente, se proponen tres posibles vías de acceso de los microorganismos implicados en infecciones relacionadas con el uso de dispositivos intravasculares (DIV) (Figura 1.4) (Ferrer & Almirante, 2014):

1. Contaminación de los líquidos de infusión administrados por vía parenteral.
2. Contaminación directa del catéter por contacto con las manos y del espacio intraluminal.
3. Contaminación de la piel adyacente al lugar de la inserción y la superficie extraluminal.

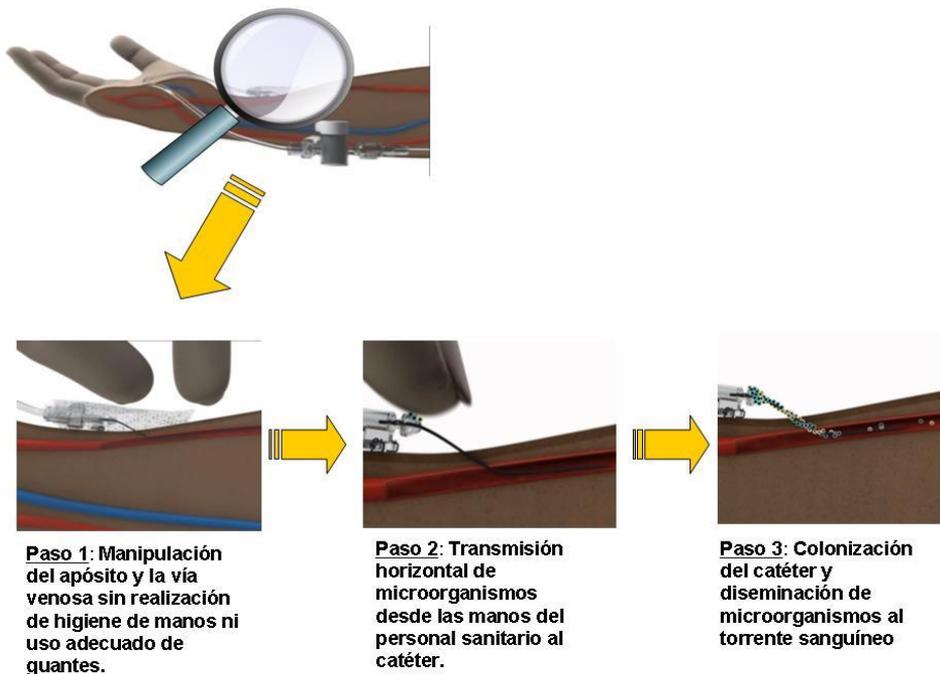


Figura 1.4. Eventos iniciales implicados en la contaminación directa de una vía venosa y generación posterior de una infección asociada a catéter (Modificado de Longtin et al., 2011).

De los tres mecanismos propuestos, la contaminación de las soluciones para la nutrición parenteral es hoy en día la causa menos probable de infección hematógena debido al desarrollo de la legislación de medicamentos y productos sanitarios que establece la realización de rigurosos controles para garantizar la esterilidad de estos productos. No obstante, dentro de todos los productos disponibles para este fin, son las soluciones ricas en lípidos las que presentan un mayor riesgo si no se cumplen las normas establecidas, ya que pueden contaminarse por diferentes especies bacterianas o fúngicas, principalmente *Candida parapsilosis* o *Malassezia furfur* (Ferrer & Almirante, 2014).

El acceso del microorganismo desde la piel adyacente al lugar de la inserción del catéter es la causa más común en la infección de los dispositivos intravenosos, principalmente en el caso de catéteres de corta duración (< 8 días) (Ferrer & Almirante, 2014). Este mecanismo

favorece la colonización externa del catéter y la posible formación posterior de una biopelícula en la pared externa del mismo. Por el contrario, el uso inadecuado de las llaves de tres vías y otros dispositivos de inyección acoplados al catéter favorecen la colonización del lumen por parte de los microorganismos presentes en las manos del personal sanitario y la posible formación de biopelícula en la cara interna del mismo.

Considerando los criterios establecidos por los CDC de los EEUU, el único tipo de infección que puede considerarse una infección relacionada a catéter (IRC) es aquella en la que además de observarse síntomas clínicos claros de bacteriemia-fungemia y/o sepsis (fiebre, escalofríos, etc.) sin otro foco aparente, se identifica la misma especie microbiana en el cultivo de la piel circundante a la zona de inserción del catéter y en la muestra de la punta del catéter, o bien entre esta última muestra y el microorganismo aislado en el hemocultivo de sangre realizado a través del catéter venoso (origen de la infección). Así mismo, se puede considerar una infección como asociada al catéter cuando la diferencia entre el tiempo de crecimiento del hemocultivo obtenido a través del catéter (origen de la infección) y la vía periférica es superior a las dos horas (Centers for Disease Control (CDC)/National Healthcare Safety Network (NHSN), 2017).

De acuerdo con estos criterios, el diagnóstico microbiológico de certeza del origen de estas infecciones se realiza mediante técnicas de cultivo semicuantitativo y cuantitativo que requieren la retirada del catéter. Sin embargo, estos métodos presentan limitaciones porque no detectan ni permiten establecer las relaciones genéticas entre los aislamientos clínicos y las diferentes especies microbianas aisladas, por lo que el diagnóstico de las IRC sigue siendo un reto y determinar que el catéter es la causa de la infección es crucial para establecer un diagnóstico correcto (Riboli et al., 2014).

1.3. Control de las infecciones

1.3.1. Infecciones nosocomiales e infecciones asociadas a la asistencia sanitaria

Tal y como se esbozó en el apartado 1.1.1, se consideran infecciones nosocomiales aquellas que han sido adquiridas durante un episodio de asistencia hospitalaria (superior a 48 horas) y que no estaban presentes ni durante el período de incubación de las mismas, ni en el momento del ingreso del paciente (Pujol & Limón, 2013). En España, el estudio EPINE realizado en 2016 estimó que alrededor del 6,84% (IC95% 6,64 – 7,05) de los pacientes hospitalizados presentaban una infección nosocomial, estimándose que la prevalencia de infección nosocomial adquirida en el presente ingreso fue del 5,50% (IC95% 5,32 – 5,69) (Grupo de estudio EPINE, 2017).

Las infecciones nosocomiales más frecuentes están asociadas con procedimientos invasivos y/o con el uso de dispositivos médicos, siendo las más comunes las infecciones urinarias, las infecciones de la herida quirúrgica, la neumonía y la bacteriemia primaria. Pero estos procedimientos invasivos no son los únicos factores responsables del desarrollo de las infecciones nosocomiales, ya que el estado de salud del propio paciente también es de gran relevancia, siendo la inmunosupresión el principal factor desencadenante de estas infecciones (Pujol & Limón, 2013).

Las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes. Por este motivo, es fundamental desarrollar técnicas preventivas y de vigilancia con el fin de reducir al máximo el número de infecciones, limitar todo lo posible la mortalidad y las secuelas en los enfermos y contener el gran gasto económico que suponen estas para los centros sanitarios (Del Pozo & Cantón, 2016; Pujol & Limón, 2013).

1.3.2. Brotes nosocomiales

Se considera un brote infeccioso a un aumento excepcional o inesperado en el número de casos de una infección conocida o de nueva aparición, con independencia de que los casos se hallen agrupados en el espacio y/o el tiempo (Girard et al., 2003).

La rápida identificación de un brote infeccioso es esencial para disminuir al máximo la transmisión del agente etiológico entre los pacientes, ya sea por mediación del personal sanitario o de material contaminado. Para el adecuado manejo de un brote infeccioso, sea nosocomial o comunitario, es necesario identificar la causa o fuente de la infección, mediante la recolección tanto de los aislamientos causantes de la infección como de los presentes en el entorno del paciente (ambiente del hospital, el domicilio o la comunidad) y los provenientes del personal sanitario, ya que como se ha comentado, estos últimos juegan un papel muy importante en la transmisión horizontal de clones microbianos entre pacientes, sobre todo en el ámbito de los distintos centros sanitarios (Girard et al., 2003; Marcos-Zambrano et al., 2014).

1.3.3. Prevención de las infecciones nosocomiales

La prevención de las infecciones nosocomiales exige un programa integrado de vigilancia y control basado en el esquema de transmisión de las infecciones que se resumen en la Figura 1.5. Este programa ha de incluir como mínimo los siguientes puntos:

1. Limitar la transmisión de microorganismos entre los pacientes, realizando prácticas apropiadas de higiene de manos, uso adecuado de guantes y otras medidas de barrera, técnicas de asepsia correctas cuando sean necesarias (inserción de catéteres, realización de procedimientos quirúrgicos, etc.) y procedimientos adecuados de esterilización y desinfección.
2. Controlar los riesgos de origen ambiental y disponer de un manual y protocolo de medidas a instaurar en caso de aparición de algún elemento de riesgo de este tipo.
3. Usar de forma apropiada la profilaxis antimicrobiana en cirugía.
4. Evitar la malnutrición en los pacientes y asegurar un buen control metabólico en los pacientes diabéticos.
5. Instaurar y/o potenciar los programas de vacunación adecuados para los pacientes y el personal sanitario.

6. Reducir al mínimo posible los procedimientos invasivos diagnósticos y terapéuticos con el fin de limitar el riesgo de infecciones endógenas y exógenas así como la formación de biopelículas en los dispositivos médicos utilizados (Tabla 1.2).
7. Identificar de forma temprana las infecciones nosocomiales, así como instaurar las medidas adecuadas para su control y la vigilancia de brotes.
8. Prevenir la infección y colonización microbiana del personal sanitario.
9. Mejorar las prácticas de atención al paciente y enseñar buenas prácticas al propio paciente.



Figura 1.5. Recomendaciones para la prevención de las infecciones asociadas a catéteres (Modificación de APIC. *Break the chain of infection*, 2016).

Tabla 1.2. Recomendaciones para la prevención de las infecciones asociadas a catéteres (Modificación de Ferrer & Almirante, 2014).

Educación sanitaria

Llevar a cabo campañas de educación sanitaria entre el personal en relación al uso de catéteres vasculares, procedimientos de inserción y mantenimiento, y medidas de control para la prevención de infecciones relacionadas.

Higiene de manos

El uso de guantes no excluye la higiene de manos, por lo que hay que instar al personal sanitario a realizar una correcta higiene de manos.

Técnicas asépticas durante la inserción y el cuidado de los catéteres

Mantener una técnica aséptica para la inserción y el cuidado de los catéteres.

Actuaciones sobre el punto de inserción de los catéteres

Antisepsia de la piel con una solución de clorhexidina al 2% antes de la inserción de los catéteres o al manipularlos y cubrir con gasas el punto de inserción.

Retirada de los catéteres vasculares

Retirar los catéteres vasculares que no sean necesarios.

Evitar recambios rutinarios, especialmente de los CVC.

Recambio de los sistemas de perfusión

Recambio de los sistemas de perfusión en un intervalo no inferior a las 72 h. Los sistemas destinados a la administración de sangre se han de cambiar cada 4 h y los de administración de emulsiones lipídicas cada 24 h.

Accesos de inyección intravenosos

Desinfectar los accesos de inyección antes de acceder al sistema, ya sea con alcohol al 70%, o con una solución de clorhexidina o yodada.

1.4. Resistencia a los fármacos antifúngicos

Existen diversas circunstancias que pueden explicar el cambio de tendencia y el incremento de las infecciones debidas a especies de *Candida* diferente de *Candida albicans*, siendo probablemente el uso generalizado de agentes antifúngicos una de las principales causas (van Asbeck et al., 2009). El estudio de la sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos juega un papel importante tanto en la orientación terapéutica y selección de los agentes antifúngicos, como en el desarrollo de nuevos fármacos y en la vigilancia de las resistencias microbiológicas (nuevas y preexistentes) a los fármacos antifúngicos mediante estudios epidemiológicos adecuados (Pfaller, 2005).

El tratamiento de las candidiasis invasivas se realiza considerando tanto criterios clínicos, microbiológicos, farmacológicos, el estado inmunológico del paciente, las características

concretas de la candidiasis (etiología, sensibilidad a los fármacos antifúngicos, localización orgánica, diseminación, etc.) y las características de los fármacos antifúngicos disponibles (administración, metabolismo, eliminación, interacciones con otros fármacos y toxicidad). Todos ellos son importantes para la toma de una decisión terapéutica adecuada (Quindós, 2015).

Aunque existen guías clínicas que incluyen el tratamiento de las candidiasis invasivas, no hay consenso respecto al tratamiento de la enfermedad invasiva originada por *Candida parapsilosis* (Aguado et al., 2011; Pappas et al., 2016a). Sin embargo, el manejo terapéutico habitualmente incluye medidas generales como la extracción de cualquier dispositivo médico (catéter, prótesis, etc.), así como la administración de fármacos antifúngicos sistémicos (Tabla 1.3) (Trofa et al., 2008). Aunque *Candida parapsilosis* es bastante sensible a la mayoría de los agentes antifúngicos disponibles (van Asbeck et al., 2009). En la mayoría de las candidiasis invasivas se utiliza equinocandinas o anfotericina B liposómica y como alternativa y en caso de contraindicación, reacción adversa y/o insuficiencia renal, se administra fluconazol (Pappas et al., 2016a; Trofa et al., 2008).

Las especies de *Candida* formadoras de biopelículas, se caracterizan por presentar una mayor resistencia tanto a los mecanismos de defensa del hospedador como a los fármacos antifúngicos. El estudio de la sensibilidad in vitro de las células sésiles de las biopelículas candidiásicas, muestra que las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los fármacos antifúngicos son mucho más elevadas que las necesarias contra las células planctónicas. Diferentes estudios coinciden en que las biopelículas por lo general son resistentes a los azoles y sensibles a los equinocandinas y la anfotericina B; sin embargo esta actividad está influida por la especie de *Candida* y el tipo de fármaco, en el caso de *Candida parapsilosis*, la micafungina es la más activa seguida de la anidulafungina y caspofungina (Del Pozo & Cantón, 2016; Perlin et al., 2017; Valentín et al., 2016; Ziccardi et al., 2015).

Tabla 1.3. Grupos principales de fármacos antifúngicos y su mecanismo de acción (Modificación de Murray et al, 2009).

Antifúngico	Vía	Mecanismo de acción
Triazoles		
Fluconazol	Oral	
Isavuconazol	Intravenosa	
Itraconazol		Inhiben la enzima 14- α -dimetilasa del lanosterol dependiente de citocromo P-450
Posaconazol		
Voriconazol		
Equinocandinas		
Anidulafungina	Intravenosa	
Caspofungina		Inhiben la síntesis de glucanos de la pared celular del hongo, al inhibir la enzima 1,3- β -D-glucano sintetasa
Micafungina		
Polienos		
Anfotericina B	Intravenosa Tópica	Se une al ergosterol y provoca su daño oxidativo directo en la membrana celular
Antimetabolitos		
Flucitosina	Oral	Inhibición de síntesis de ADN y ARN

1.5. Diagnóstico de laboratorio

La identificación microbiológica de los aislamientos de *Candida* se lleva a cabo atendiendo a criterios tanto morfológicos, bioquímicos y fisiológicos como genotípicos. A continuación, se describen algunos de los métodos microbiológicos convencionales y moleculares empleados más frecuentemente para identificar las tres especies del complejo *Candida parapsilosis*.

1.5.1. Métodos microbiológicos convencionales

Los medios cromógenos como CHROMagar *Candida* (Becton, EEUU) y ChromID *Candida* (bioMérieux, Francia) son medios diferenciales útiles para la identificación de algunas de las especies del género *Candida*. El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromógeno en presencia de un indicador de la enzima (Eraso et al., 2006; Linares-Sicilia & Solís-Cuesta, 2007). La identificación del complejo *Candida parapsilosis* empleando este método puede ser complicada ya que las especies pertenecientes a este complejo pueden

adoptar diferentes coloraciones que van desde el blanco al malva que no permiten su identificación presuntiva (Eraso et al., 2006).

La identificación definitiva se efectúa principalmente por las características fisiológicas o bioquímicas de estas especies, mediante la utilización de ciertos métodos, como la galería bioquímica API ID 32C (bioMérieux). Este sistema de identificación se basa en la capacidad del microorganismo para asimilar de forma diferente los distintos carbohidratos u otras fuentes de carbono, generándose así un perfil bioquímico característico y distintivo de cada especie (Truant, 2002).

Sin embargo, el complejo *Candida parapsilosis* presenta una elevada variabilidad genética con escasa variabilidad fenotípica. Este hecho condiciona la capacidad de los métodos microbiológicos convencionales para identificar de manera fiable las especies crípticas que componen el complejo. Por ello, cada vez más se recurre a técnicas moleculares, para identificar y diferenciar de manera precisa entre *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis*.

1.5.2. Métodos moleculares

Por lo general los métodos moleculares empleados para la identificación, son técnicas basadas en el análisis del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa, referida a ella como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*). Esta reacción enzimática permite la amplificación exponencial de fragmentos específicos de ADN (K.B. Mullis & Faloona, 1987).

En las últimas décadas la PCR se ha convertido en un método atractivo y relativamente generalizado en la práctica clínica para la identificación rápida y fiable de diversos microorganismos causantes de enfermedades infecciosas de interés clínico. En concreto para la identificación de especies fúngicas comunes suelen emplearse las regiones denominadas *Internal Transcribed Spacers* (ITS) que se componen de genes multicopia dispuestos en tándem en regiones no codificantes que separan a las regiones codificantes de las subunidades 18S, 5,8S y 26S del ARN ribosómico (Petti & Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008). El desarrollo de la PCR y el diseño de cebadores universales (ITS1,

ITS4) han facilitado la investigación de las características taxonómicas y filogenéticas entre especies del mismo género (Figura 1.6) (Marcos-Zambrano et al., 2014; White et al., 1990).



Figura 1.6. Regiones *Internal Transcribed Spacers* (ITS).

Otro método molecular muy utilizado para la identificación de levaduras es el denominado *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). En la PCR-RFLP, se amplifican fragmentos específicos de ADN, que tras la PCR son tratados con endonucleasas de restricción que generan patrones de corte específicos. Las diferencias en las secuencias nucleotídicas de las diferentes especies darán lugar a un patrón de bandas característico de la especie (Orberá Ratón, 2004).

La identificación molecular del complejo *Candida parapsilosis* se centra principalmente en técnicas basadas en el análisis del ADN como ITS y RFLP. La más empleada es la amplificación de un fragmento del gen de la deshidrogenasa alcohólica secundaria (*SADH*) mediante PCR-RFLP. El producto de PCR resultante se digiere con la enzima de restricción *BanI* obteniéndose fragmentos cortos, que tras una electroforesis en gel de agarosa y comparación de los patrones de bandas obtenidos característicos de cada especie, permiten diferenciar entre las tres especies pertenecientes al complejo *Candida parapsilosis* (Marcos-Zambrano et al., 2014; Miranda-Zapico et al., 2011; Tavanti et al., 2005)

1.5.3. Técnicas de tipificación molecular

Los métodos de tipificación comprenden una gran variedad de técnicas capaces de comparar secuencias génicas de dos o más cepas, de modo que se puede conocer la relación filogenética entre varios aislamientos clínicos. La principal característica de estas técnicas es

que son capaces de diferenciar aislamientos clínicos no relacionados, con independencia de si pertenecen a la misma especie microbiológica, siendo muy útiles para esclarecer el origen de una infección y contribuir a su posterior seguimiento hasta que se consigue su erradicación. Las técnicas más utilizadas para la tipificación del complejo *Candida parapsilosis* son el *Southern Blot* con sonda Cp-13, la amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (Rep-PCR) y la espectrofotometría de masas de desorción/ionización (MALDI-TOF) (Marcos-Zambrano et al., 2014). Sin embargo, debido al elevado poder discriminatorio, reproducibilidad y fiabilidad de las técnicas de genotipificación basadas en microsatélites, comparado con las demás técnicas moleculares de tipificación, han convertido esta técnica de genotipificación basadas en microsatélites en una técnica de referencia para la tipificación de aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* (Magobo et al., 2017; Romeo et al., 2013)

1.5.3.1. Microsatélites o *Short Tandem Repeats* (STR)

Los microsatélites, también conocidos como *short tandem repeats* (STR), son secuencias de ADN compuestas por unidades nucleotídicas de entre dos y seis pares de bases repetidas en tándem un número variable de veces y que se encuentran distribuidas ampliamente al azar en el genoma de todos los organismos eucariotas (García-Hermoso, 2016; Vázquez-Lobo & Morales-García, 2014).

Se localizan de forma preferente en las regiones no codificantes del genoma y, de forma infrecuente, en las regiones codificantes. Se caracterizan por ser altamente polimorfos como consecuencia de su elevada tasa de mutación, por lo que son adecuados para su uso como marcadores moleculares (Putman & Carbone, 2014).

1.5.3.1.1 Clasificación de los STR

Los *loci* microsatélites pueden variar en el tamaño de la unidad de repetición, en el número de veces que se repite/n la/s unidad/es y en las características del patrón de repetición. Según el número de pares de bases que constituye la unidad de repetición, se pueden diferenciar STR compuestos por repeticiones del mismo nucleótido (mononucleótidos), por dos (dinucleótidos), por tres (trinucleótidos) y así hasta seis nucleótidos (hexanucleótidos), siendo las más comunes las repeticiones dinucleotídicas, trinucleotídicas y tetranucleotídicas (Selkoe & Toonen, 2006).

En cuanto al patrón de repetición, los STR se clasifican en: compuestos, cuando están conformados por dos o más motivos repetitivos (ejemplo, TATATATATAGTGTGTGTGT); perfectos o puros si están compuestos por un único motivo sin interrupciones (ejemplo, TATATATATATATATA) y STR interrumpidos o imperfectos cuando un nucleótido o más se inserta entre el motivo repetitivo (ejemplo, TATATATACTATATATA) (Oliveira, 2006; Vázquez-Lobo & Morales-García, 2014).

1.5.3.1.2 Mecanismos de mutación

El patrón de mutación de los microsatélites se debe, en la mayoría de los casos, a alteraciones en su longitud, producidas tanto por la ganancia como por la pérdida de nucleótidos que conforman la unidad de repetición (Selkoe & Toonen, 2006).

La tasa de mutación que presentan, va desde 10^{-2} hasta 10^{-6} (promedio 5×10^{-4}) nucleótidos por *locus* y por generación (Oliveira et al., 2006). La elevada tasa de mutación que presentan (Oliveira et al., 2006; Schlötterer, 2000), se atribuye a diferentes mecanismos de mutación como:

1. Inclusión de errores durante la recombinación.
2. Fenómenos de entrecruzamiento desigual.
3. Deslizamiento de la polimerasa durante la replicación o reparación del ADN.

El mecanismo de entrecruzamiento desigual puede tener lugar durante la recombinación del ADN, dando como resultado la pérdida de repeticiones en una de las cromátidas y ganancia

de repeticiones en la homóloga (Oliveira et al., 2006; Vázquez-Lobo & Morales-García, 2014). Sin embargo, algunos estudios han determinado la presencia de mutaciones en regiones microsatélites en ausencia de recombinación, sugiriendo que este no es un mecanismo predominante en el origen de la variabilidad de los microsatélites (Oliveira et al., 2006).

Durante la replicación o reparación del ADN, pueden ocurrir alineamientos erróneos por el deslizamiento de la ADN polimerasa. Este fenómeno consiste en la formación de alineamientos erróneos por deslizamiento de la ADN polimerasa durante la extensión de la nueva cadena de ADN. Cuando el deslizamiento tiene lugar en la hebra nueva se produce un incremento del número de repeticiones del microsatélite (inserción), mientras que cuando el deslizamiento ocurre en la hebra molde hay un decremento del número de repeticiones (delección) (Oliveira et al., 2006; Schlötterer, 2000; Wierdl, 1997). Se ha demostrado in vitro que el deslizamiento de la polimerasa ocurre con una frecuencia muy elevada. Sin embargo, existe una discrepancia importante entre el grado de mutaciones observado en estudios in vitro e in vivo. Se cree que esta diferencia es debida a la presencia en in vivo de un sistema reparador de errores. Se ha observado que un sistema de reparación funcional, es capaz de reducir la ratio de mutación en los microsatélites entre 100 y 1000 veces (Schlötterer, 2000).

1.5.3.1.3 Métodos de análisis de los STR

El ADN que rodea a la región STR, denominada región flanqueante, está altamente conservada (es idéntica) entre los individuos de una misma especie y, en algunas ocasiones entre diferentes especies, lo que permite el diseño de cebadores específicos y la posterior identificación de los *loci* microsatélites mediante amplificación por PCR (Selkoe & Toonen, 2006).

La utilización de PCR múltiples permiten la amplificación de varios *loci* simultáneamente, disminuyendo el tiempo de análisis (Edwards & Gibbs, 1994). Una reacción múltiple consiste en combinar en una única reacción todos los pares de cebadores específicos de las regiones STR que se quieren analizar, junto con el resto de componentes de la PCR. Esta técnica tiene

la misma especificidad y eficiencia que las PCR sencillas, siempre y cuando no existan fenómenos competitivos en la reacción (Mullis, 1991).

Los productos de PCR pueden ser detectados por electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida, o bien, a través de secuenciadores automáticos (electroforesis capilar) (Vázquez-Lobo & Morales-García, 2014). El análisis en geles de agarosa es relativamente sencillo; sin embargo, tiene baja resolución por lo que se recomienda su utilización únicamente para verificar el éxito de la amplificación. La electroforesis en geles de poliacrilamida poseen un grado mayor de resolución y permiten la separación de fragmentos con diferencias de tamaño de hasta un par de bases; sin embargo, la técnica es laboriosa y no está exenta de cierta complejidad técnica (Vázquez-Lobo & Morales-García, 2014).

Por su parte, la electroforesis capilar presenta una efectividad mayor, en comparación con las electroforesis mencionadas anteriormente, ya que permite la inyección, separación y detección de los fragmentos de un número alto de muestras de una manera totalmente automatizada. Los secuenciadores automáticos tienen la ventaja de no necesitar la utilización de un gel como soporte, ya que en su lugar utilizan un polímero que se inyecta de forma automática en un capilar antes de cargar la muestra. Como en estos secuenciadores la disipación del calor es muy efectiva, se pueden aplicar voltajes mayores en la electroforesis, lo que se traduce en una reducción del tiempo de análisis y una mayor resolución (Barron & Blanch, 1995; Vázquez-Lobo & Morales-García, 2014).

En los secuenciadores automáticos, los fragmentos de PCR migran y se separan en función de su tamaño. Estos equipos van a detectar dichos fragmentos a través de un láser de argón, el cual detecta una señal fluorescente que corresponde con cada alelo. Por ello, para que las muestras puedan ser detectadas por el láser, es necesario que los productos amplificados estén marcados con diferentes fluorocromos. En el caso de la genotipificación de *loci* STR el marcaje se realiza en el extremo 5' del cebador y sólo es necesario marcar uno de los cebadores por cada *locus* estudiado, el *Forward* (FWD) o el *Reverse* (REV). Cuando estos, son excitados por el láser, los fluorocromos emiten luz a diferentes longitudes de onda que es

recogida por una cámara fotográfica CCD que convierte la información fluorescente en datos digitales (Vázquez-Lobo & Morales-García, 2014).

Con la inyección de cada muestra en el capilar se carga un patrón interno que contiene fragmentos de ADN con un tamaño molecular conocidos. Los equipos empleados para llevar a cabo la electroforesis capilar presentan múltiples capilares que permiten procesar hasta 96 muestras en paralelo (Butler, 1998; Dolník, 1999).

Cada señal fluorescente se representa como un pico de lectura, y será el programa informático, mediante un cálculo de regresión y en base al tiempo de migración de los fragmentos del estándar interno, el encargado de determinar el tamaño en pares de bases de cada uno de los alelos (Figura 1.7) (Butler, 1998).

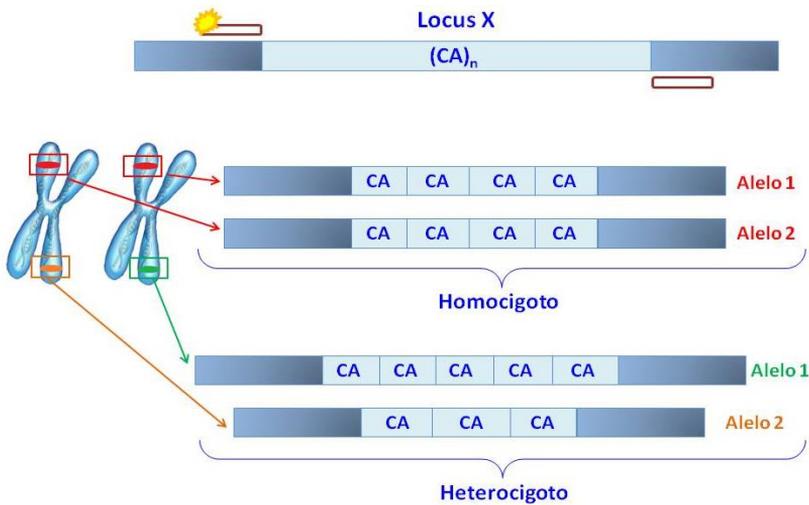


Figura 1.7. Ejemplo de regiones STR.

1.5.3.1.4 ¿Por qué usar STR como marcador molecular para la tipificación molecular de *Candida parapsilosis*?

Los marcadores moleculares basados en el ADN se caracterizan por su capacidad para evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre diferentes especies permitiendo el seguimiento de estas a través de las sucesivas generaciones. Se han descrito numerosas técnicas con este fin, entre las que destacan RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), STR (*Short Tandem Repeat*) o SSR (*Simple Sequence Repeat*). Sin embargo, el poder de discriminación de la mayoría de estas técnicas en relación a la subtipificación o identificación de *Candida parapsilosis* es reducido y un número considerable de aislamientos no pueden ser diferenciados (E. C. van Asbeck et al., 2009). Con el fin de soslayar este problema, se emplean los marcadores polimorfos de tipo microsatélites (tales como STR), merced al alto poder de discriminación y reproducibilidad de esta serie de técnicas, lo que permite obtener una mayor discriminación entre aislamientos clínicos y ambientales de *Candida parapsilosis* (Lasker, 2006; van Asbeck, 2008). Entre las posibles ventajas del uso de un sistema de genotipificación basado en marcadores microsatélites cabe la pena destacar que:

1. Son regiones de longitud corta por lo que se pueden amplificar a través de PCR, incluso a partir de muestras de ADN escasas o degradadas, ya que el material genético necesario no tiene que ser de mucha calidad (Selkoe & Toonen, 2006).
2. Son secuencias ampliamente distribuidas en el genoma y repartidas de forma más o menos homogénea (Forbes, 1995).
3. Son marcadores codominantes, lo que permite diferenciar entre microorganismos homocigotos (alelos iguales para un mismo *locus*) y heterocigotos (alelos diferentes para un mismo *locus*).
4. Presentan una elevada variabilidad (multialélicos).

5. Poseen un elevado polimorfismo como consecuencia de su alta tasa de mutación, y por lo tanto un elevado poder de discriminación entre individuos (Selkoe & Toonen, 2006).
6. Su análisis se lleva a cabo con métodos automatizados lo que permite la obtención de resultados reproducibles y la posibilidad de poder intercambiarlos entre laboratorios.
7. Se puede realizar el análisis de varios marcadores (*loci*) en una sola reacción de PCR (PCR múltiple), reduciendo los costes económicos y agilizando la obtención de los resultados.

Todas estas características han propiciado que el uso de protocolos de tipificación molecular de microorganismos basados en la amplificación y análisis de fragmentos de regiones microsatélites se haya extendido ya que presentan una multitud de características ventajosas frente a otros tipos de marcadores y técnicas de genotipificación. En la actualidad se ha empleado el análisis de los STR en *Candida parapsilosis sensu stricto* con diferentes objetivos y en distintos campos de aplicación entre los cuales merece la pena resaltar:

1. Elaboración de mapas genéticos, con el objetivo de identificar la localización de genes de interés, principalmente aquellos implicados en determinadas enfermedades.
2. La genotipificación de cepas pertenecientes a una misma especie o especies diferentes
3. La realización de estudios filogenéticos para estudiar bien la variación genética o las relaciones evolutivas entre aislamientos, así como identificar la presencia de aislamientos clonales dentro de una serie de muestras.
4. La identificación de brotes hospitalarios, así como su control y el seguimiento generacional de las infecciones.

1.5.4 La tipificación molecular en el estudio de brotes nosocomiales por *Candida parapsilosis*

Como ejemplo y compendio de lo mencionado con anterioridad, cabe destacar que se han realizado estudios relacionados con brotes nosocomiales causados por especies del género *Candida*, siendo especialmente relevantes los casos debidos a *Candida albicans*. Sin embargo, se ha observado que *Candida parapsilosis sensu stricto* es uno de los principales microorganismos de este género responsable de un número significativo de brotes nosocomiales, especialmente en UCI (Wang, 2016).

En la Tabla 1.4 aparece un resumen de algunos de los brotes de *Candida parapsilosis* a lo largo de diferentes años y países. Aproximadamente la mitad de los artículos referenciados en dicha tabla describen brotes en UCI neonatales y dos de ellos se desarrollaron en UCI pediátricas (Barchiesi et al., 2004; García San Miguel et al., 2004). Así mismo, cabe destacar los dos últimos estudios realizados en 2016 puesto que son los únicos que se han realizado en el ambiente hospitalario (Magobo et al., 2017; Wang, 2016). Si analizamos las técnicas microbiológicas empleadas para el estudio de esta serie de brotes, llama la atención que en nueve de estos estudios, la genotipificación de los aislamientos clínicos se llevó a cabo mediante la técnica de microsátélites, y tres de ellos que compararon la genotipificación por STR con otras técnicas concluyeron que los STR son la técnica que mayor poder discriminatorio y reproducibilidad presentan, considerándolos un método ideal para realizar estudios epidemiológicos (Brillowska-Dabrowska et al., 2009; Diab-Elschahawi et al., 2012; Pulcrano et al., 2012).

Tabla 1.4. Brotes de *Candida parapsilosis* (Modificación de Wang et al., 2016).

Referencia	Año del estudio	País	Técnica de genotipificación
Barchiesi et al., 2004	1999	Italia	Cariotipo electroforético
García San Miguel et al., 2004	2004	España	Cariotipo electroforético, RAPD
Kuhn et al., 2004	2001	EEUU	<i>DNA fingerprinting</i>
Dizbay et al., 2008	2006-2008	Turquía	RAPD
Reiss et al., 2008	1998-2000	EEUU	Cp3-13
Brillowska-Dabrowska et al., 2009	2006-2007	Suecia	STR RAPD
Hernández-Castro et al., 2010	2010	México	RAPD
Vaz et al., 2011	2003	Portugal	STR
Diab-Elschahawi et al., 2012	2006-2008	Austria	STR Rep-PCR
Pulcrano et al., 2012	2007-2011	Italia	STR PFGE MALDI-TOF
Reiss et al., 2012	2012	EEUU	STR
Miranda et al., 2012	2002-2008	Brasil	PFGE RAPD
Romeo et al., 2013	2011-2012	Italia	STR
da Silva et al., 2013	2012	Brasil	STR
Wang et al., 2016	2010-2014	China	STR
Magobo et al., 2016	2009-2010	Sudáfrica	STR

Como se ha comentado en apartados anteriores, *Candida parapsilosis* se caracteriza por su habilidad para colonizar la piel y mucosas humanas, y otras superficies inanimadas, favoreciendo su persistencia en el ambiente hospitalario y su adhesión a catéteres u otros dispositivos médicos. Por lo que una rápida identificación molecular de los aislamientos de *Candida parapsilosis* y la investigación de su clonalidad, puede contribuir a un control efectivo de aquellos brotes causados por esta especie mediante la instauración de las medidas necesarias (Wang, 2016).

En resumen, considerando que la gran mayoría de las infecciones por el complejo *Candida parapsilosis* están ligadas a la asistencia sanitaria y que estos microorganismos tienen una serie de características fenotípicas y genotípicas que les permiten sobrevivir en el

medio hospitalario, parece relevante la adaptación y validación de una técnica de genotipificación para este complejo, tal y como se propone en el presente trabajo de Tesis Doctoral, con el fin de mejorar el manejo adecuado de este tipo de infecciones y garantizar una respuesta rápida a las mismas que redunde en la prevención de la aparición de brotes nosocomiales.



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. Justificación y objetivos

2.1. Justificación

A lo largo de la última década y con las mejoras aportadas en el campo de la biología molecular, diversos estudios han aportado evidencias suficientes de que la tipificación molecular de regiones microsátélites (STR) es una herramienta útil para detectar variaciones microevolutivas en el material genético de diferentes microorganismos (incluidos los hongos) obtenido de diversas fuentes, tales como cepas de referencia, muestras clínicas, muestras ambientales, etc. Este hecho posibilita el establecimiento de relaciones filogenéticas entre los distintos aislamientos y tiene numerosas aplicaciones en áreas tan dispares como los mecanismos epidemiológicos asociados a la interacción entre patógeno y huésped o la identificación de mecanismos de transmisión de un microorganismo entre la población y el entorno (Romeo et al., 2013; Sabino et al., 2010; van Asbeck et al., 2009).

En este sentido, la aplicación de los STR en la detección de brotes nosocomiales causados por distintas especies de *Candida* puede ser una herramienta de aplicación directa y enorme utilidad en el campo de diagnóstico microbiológico, provocando un impacto directo tanto en el control de la infección como en el conocimiento epidemiológico más profundo de aquellos factores que se encuentran asociados a la candidiasis nosocomial y posibilitar la adopción de medidas preventivas que permitan disminuir la incidencia de estas infecciones en las poblaciones con un riesgo mayor de sufrirlas.

A pesar de las ventajas y aplicaciones descritas para el estudio y detección de STR y de ser considerada por muchos autores una técnica molecular de genotipificación con alto poder de discriminación (incluyendo la diferenciación de aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto*), esta técnica no está suficientemente difundida probablemente por su relativa laboriosidad y por presentar ciertas peculiaridades técnicas que dificultan la estandarización. Pese a lo descrito anteriormente, Lasker y colaboradores en 2006 y después Sabino y colaboradores en 2010 describieron sendos protocolos basados en la detección y estudio de marcadores STR situados en diferentes regiones del genoma con el objetivo de obtener un método de genotipificación fiable tanto de cepas de referencia como

de aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto* (Lasker et al., 2006; Raquel Sabino et al., 2010).

Pese a este gran avance, la técnica descrita por Sabino y colaboradores, considerada como referente, ha sufrido pequeñas modificaciones, tales como el rediseño de algunos de los *loci* propuestos con objeto de mejorar los resultados obtenidos (Barbedo et al., 2015; Diab-Elschahawi et al., 2012; Vaz et al., 2011). No obstante, todos los protocolos publicados se han realizado como una técnica *singleplex* con cada uno de los cuatro *loci* amplificados por separado. Además, sólo se ha enfocado el análisis de los resultados obtenidos hacia la estimación del poder discriminatorio de los marcadores descritos tanto en el trabajo original, como en las modificaciones realizadas al mismo con posterioridad.

El presente trabajo de Tesis Doctoral ha pretendido, en primer lugar, modificar el protocolo *singleplex* de PCR original descrito por Sabino y colaboradores en 2010, mediante el desarrollo de un nuevo protocolo de detección múltiple en una sola reacción de PCR *multiplex*, variando las condiciones de temperatura originales e incluyendo un esquema de gradiente decreciente de temperatura de hibridación (*touchdown*).

La segunda pretensión ha sido valorar la eficacia del protocolo optimizado, a través del estudio de dos aspectos fundamentales en cualquier evaluación de una prueba diagnóstica (Santabárbara-Serrano, 2016) como son la validación interna del rendimiento de la misma (mediante la estimación de la sensibilidad y especificidad de la técnica) y su concordancia (mediante la estimación del índice kappa) con estándares técnicos adoptados por norma o de manera tácita en la literatura (en nuestro caso el protocolo original publicado por Sabino y colaboradores en 2010). Tras la oportuna revisión bibliográfica realizada, no hay evidencia de que ninguno de estos aspectos haya sido estudiado hasta el momento actual, quedando por tanto la validación de esta prueba sin un estudio exhaustivo y con una caracterización parcial de la misma.

En resumen, este trabajo pretende avanzar en la utilidad y aplicabilidad de esta técnica «novedosa» tras la adaptación del protocolo original, mediante la validación de la eficacia y la efectividad de esta mediante el estudio tanto de cepas de referencia como aislamientos

clínicos de *Candida parapsilosis* obtenidos de pacientes con candidemia asociada a dispositivos intravasculares. Además, se ha planteado la realización de un análisis del poder discriminativo de la misma, similar al realizado por otros autores en trabajos previos, empleando como muestra los aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto* procedentes del estudio FUNGEMYCA, un estudio multicéntrico de las candidemias invasivas en España (Pemán, Cantón, Linares-Sicilia, et al., 2011).

2.2. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido la validación de un protocolo de PCR múltiple para la genotipificación de aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto* mediante microsatélites.

Para la consecución de dicho objetivo principal se propusieron los siguientes objetivos secundarios:

1. Optimizar el conjunto de cebadores y componentes de la PCR.
2. Valorar el efecto de distintas enzimas polimerasas y sus respectivas soluciones tampón en los resultados obtenidos tras la realización de la reacción de PCR.
3. Desarrollar un protocolo de amplificación *touchdown* con el fin de aumentar la especificidad de los productos de PCR.
4. Comprobar la eficacia de la técnica mediante la estimación de la sensibilidad, especificidad, sus intervalos de confianza (IC) al 95% y la concordancia tomando como patrón oro (*Gold Standard*) el método de genotipificación mediante STR descrito por Sabino y colaboradores en 2010.
5. Evaluar la efectividad de la técnica una vez validada, en el diagnóstico de las candidemias relacionadas con el catéter (CRC).
6. Comprobar la aplicabilidad de la técnica al estudio de las relaciones filogenéticas entre los diferentes aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* procedentes de muestras clínicas de sangre obtenidas durante el estudio FUNGEMYCA de

candidemia observacional prospectivo, realizado a lo largo de los años 2009 y 2010 en España.



MATERIALES Y MÉTODOS

3. Material y métodos

3.1. Diseño del estudio

Para la consecución de los objetivos propuestos se ha realizado un estudio de validación de una prueba diagnóstica, pero con dos enfoques diferentes, con el fin de alcanzar los objetivos secundarios y las distintas peculiaridades de los mismos. Para la realización de los cuatro primeros objetivos secundarios, se realizaron dos ensayos, uno seriado de adaptación del protocolo de una prueba de genotipificación por PCR, y otro final de evaluación de una prueba diagnóstica para evaluar los resultados obtenidos con el nuevo protocolo de genotipificación por PCR múltiple (diseñado), en comparación con la técnica de genotipificación por microsatélites descrita por Sabino y colaboradores (2010). Esta última técnica de genotipificación se consideró el patrón oro en la comparación. Esta opción permitió valorar la validez interna de la nueva técnica propuesta y su eficacia en condiciones ideales. Sin embargo, al incorporar la evaluación en términos de aplicación y efectividad (en condiciones reales) esta estrategia no fue válida siendo necesaria la realización de estudios observacionales que permitieran dar respuestas a la finalidad planteada en los objetivos secundarios cinco y seis. Los diseños esbozados en esta introducción, así como las técnicas de muestreo y de análisis empleadas se describirán específicamente a continuación para cada uno de los seis subapartados en los cuales se dividen los tres grandes bloques experimentales realizados a lo largo del presente trabajo de Tesis de doctorado.

3.2. Metodología empleada para valorar la eficacia de un protocolo de PCR múltiple para la genotipificación mediante STR (Objetivos secundarios 1-4).

- **Tipo de estudio**

Estudio de evaluación de una prueba diagnóstica.

- **Técnica de muestreo empleada**

Muestreo de conveniencia.

- **Cepas empleadas**

Se emplearon 13 cepas de referencia tanto de la colección *American Type Culture Collection* (ATCC, EEUU), *National Collection of Pathogenic Fungi* (NCPF, Reino Unido), *National Collection of Yeast Cultures* (NCYC, Reino Unido) y *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS, Holanda) que se detallan en el próximo párrafo.

Las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida parapsilosis* ATCC MYA-4646 (CDC317) se emplearon como controles positivos, mientras que las cepas genéticamente relacionadas con *Candida parapsilosis*, como *Candida orthopsilosis* ATCC 96139, *Candida metapsilosis* ATCC 96143 y otras levaduras del género *Candida* como las cepas de referencia *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida africana* ATCC MYA-2669, *Candida dubliniensis* NCPF 3949, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida bracarensis* NCYC 3133, *Candida nivariensis* CBS 9984, *Candida tropicalis* NCPF 311, *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida guilliermondii* NCPF 3099 fueron añadidas como controles subrogados negativos para valorar la especificidad de detección de la técnica. Finalmente, también se incluyó un control, agua de grado PCR (Roche Diagnostics, Alemania) estrictamente negativo sin material genético, con el fin de disponer de un control externo de la reacción de PCR.

- **Regiones microsátélites (*loci*) empleadas**

El protocolo de PCR múltiple para la genotipificación de *Candida parapsilosis sensu stricto* se realizó con cuatro marcadores STR denominados CP1, CP4, CP6 y B5 descritos previamente por Sabino y colaboradores en 2010 (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Regiones microsatélites incluidas en este estudio.

STR	Nº de acceso ¹	Cromosoma ²	Counting ²	Motivo repetitivo
CP1	cpara1131h11.p1k	8	005807	(AAG) ₂₇
CP4	cpara838b06.q1k	4	006372	(AAC) ₂₉
CP6	cpara692b10.q1k	2	005809	(AAC) ₄₈
B5		2	005809	(CA) ₃₀

¹ Número de acceso de la secuencia en el *Sanger Institute*: (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/c_parapsilosis).

² Datos obtenidos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

En la Tabla 3.2 se muestran los cebadores empleados para amplificar los *loci* referenciados en la Tabla 3.1, así como tamaños teóricos esperados con cada uno de los marcadores. Los cebadores directos o *forward* de cada una de las parejas empleadas fueron marcados en su extremo 5' con diferentes fluorocromos: 5' 6-Fluorescein (56-FAM), 5' MAX (NHS Ester) (5MAXN), 5' 5-TAMRATM (Azida) (55-TAMK), y finalmente 5' Rhodamine RedTM-X (NHS Ester) (5RhoR-XN) (IDT, Bélgica) con el fin de poder identificar de manera inequívoca el producto de PCR obtenido a partir de la amplificación de cada *locus* y generar resultados fiables de manera automática mediante la realización de una electroforesis capilar.

Tabla 3.2. Cebadores empleados para amplificar los *loci* STR seleccionados.

Locus	Secuencia del cebador ¹	Fluorocromo ²	Tamaño esperado del fragmento (pb)
CP1	FWD 5' AAAGTGCTACACACGCATCG 3' REV 5' GGCTTGCAATTTTCATTTCT 3'	56-FAM	207-270
CP4	FWD 5' CAAATCATCCAGCTTCAAACC 3' REV 5' CATCAAACAAGAATTCGATATCAC 3'	5MAXN	299-386
CP6	FWD 5' CAGGAACAGGACAATGGTGA 3' REV 5' TCTGGAGCTCTAGGACGTTT 3'	55-TAMK	177-375
B5	FWD 5' AGGTTTGTAGTAGTGTCCCTATGG 3' REV 5' TATCTCTCTCGCCATTTGAACG 3'	5RhoR-XN	95-135

¹FWD, Cebador *forward*; REV, Cebador *reverse*.

²56-FAM: 56-carboxi-fluoresceína; 5MAXN: Max 557 NHS Ester; 55-TAMK: TAMRA-tetrametil-6-carboxirodamina; 5RhoR-XN: Rhodamina Red-X.

- **Diseño experimental**

Para la creación y optimización del protocolo de PCR múltiple con una técnica de gradiente decreciente de temperatura de hibridación (*touchdown*) se emplearon tres tipos de experimentos:

- a. Ensayo dirigido a optimizar el conjunto de cebadores y distintos componentes de la reacción de PCR ($MgCl_2$, tipo de *Taq* polimerasa, etc.).
- b. Ensayos dirigidos a valorar la efectividad de la actividad de la enzima *Taq* polimerasa escogida para realizar la amplificación del ADN contenido en cada reacción de PCR.
- c. Desarrollo del protocolo de amplificación *touchdown* para aumentar la especificidad de los productos de PCR obtenidos a partir de una reacción múltiple.

Una vez realizadas las tres etapas anteriores se dispondrá de un protocolo de PCR múltiple ajustado y se procedió a la valoración de su validez interna en condiciones ideales (eficacia).

a. Ensayos de optimización del conjunto de cebadores y componentes de la PCR

En la Figura 3.1 se describe de forma esquemática como se realizó la optimización del conjunto de cebadores empleados en la PCR.

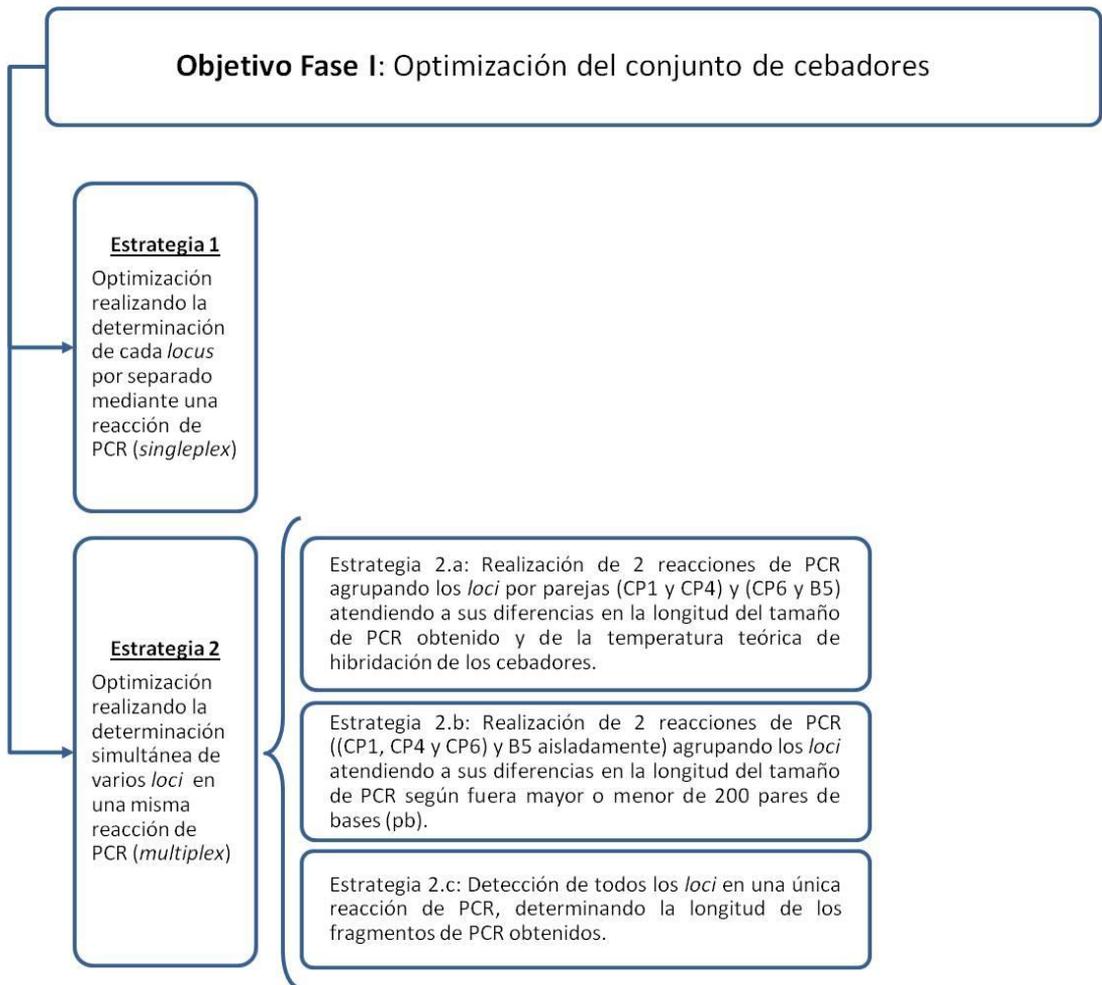


Figura 3.1. Esquema de los ensayos realizados para la optimización de los cebadores.

El objetivo del primer ensayo fue la optimización de la concentración de cada pareja de cebadores de cada uno de los *locus* a amplificar por separado mediante realización de reacciones de PCR únicas (*singleplex*).

Una vez obtenida la concentración óptima de cada pareja de cebadores por separado, se inició el segundo ensayo que consistió en la amplificación de todas las regiones de interés delimitadas por las distintas parejas de cebadores, de manera simultánea empleando para ello una sola reacción de PCR (*multiplex*) (Figura 3.2).

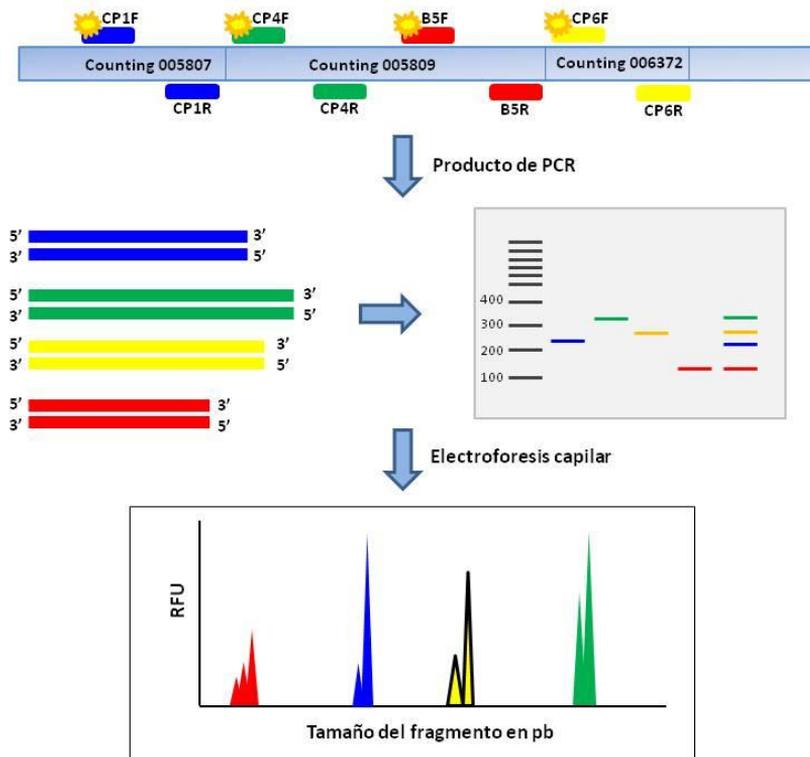


Figura 3.2. Representación gráfica el desarrollo de la PCR múltiple.

Para asegurar el resultado y verificar la eficacia de la reacción de PCR múltiple diseñada, se procedió a realizar la unión de las distintas parejas de cebadores de manera secuencial en función de su temperatura de hibridación teórica o del tamaño esperado del producto de PCR obtenido tras la amplificación. Así, en primer lugar, se agruparon las parejas de cebadores con temperaturas de hibridación similares, correspondientes a los *loci* CP1 y CP4, por un lado, y CP6 y B5, por el otro. En el segundo paso se agruparon las parejas de

cebadores en función de la homología del tamaño esperado del producto de PCR a obtener agrupándose los *loci* CP1, CP4 y CP6 en una misma reacción, y dejando una reacción de PCR aislada (*singleplex*) para la amplificación de la región correspondiente al *locus* B5, debido a que la longitud esperada de su producto de PCR era aproximadamente el 50% del tamaño esperado para los productos de PCR resultantes de la amplificación de los otros *loci*.

Por último, se optó por agrupar los pares de cebadores correspondientes a los cuatro *loci* en una única reacción de PCR múltiple, determinando si la longitud de los fragmentos de PCR obtenidos eran los esperados.

En la Tabla 3.3 se indican las concentraciones ensayadas, así como las PCR múltiples realizadas.

Tabla 3.3. Concentraciones y combinaciones ensayadas de los *loci*.

Ensayo de PCR ¹	Concentraciones ensayadas de los cebadores 25 µM (µl)									
	0,2-0,2	0,2-0,3	0,2-0,4	0,2-0,5	0,3-0,3	0,3-0,4	0,3-0,5	0,4-0,4	0,4-0,5	0,5-0,5
Ensayo 2.a	CP1- CP4	CP1- CP4	CP1- CP4	CP1- CP4	CP1- CP4	CP1- CP4	CP1- CP4	CP1- CP4	CP1- CP4	CP1- CP4
	CP6- B5	CP6- B5	CP6- B5	CP6- B5	CP6- B5	CP6- B5	CP6- B5	CP6- B5	CP6- B5	CP6- B5
Ensayo 2.b	CP1- CP4- CP6	CP1- CP4- CP6	CP1- CP4- CP6	CP1- CP4- CP6	CP1- CP4- CP6	CP1- CP4- CP6	CP1- CP4- CP6	CP1- CP4- CP6	CP1- CP4- CP6	CP1- CP4- CP6
	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5
	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5	CP1- CP4- CP6- B5

¹ Ensayos realizados para la optimización de los cebadores (Figura 3.1).

El análisis de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación de todas las pruebas ensayadas se realizó en geles de agarosa de baja electroendoósmosis (EEO) al 1% en TBE 1X (Tris-borato EDTA) teñido con GelRed Nucleic Acid Gel Stain disuelto en agua a una concentración 10000X (Biotium, EEUU), un fluorocromo intercalante que se sitúa entre los puentes de la hélice de ADN y es capaz de teñirlo en geles de agarosa. Para estimar la

longitud de los productos de PCR obtenidos, se empleó HyperLadder™ 100 pb (Bioline, Inglaterra) como marcador de peso molecular.

La electroforesis de las muestras se efectuó a un voltaje constante de 90 V/cm durante 80 min empleando un equipo PowerPac 300 (Bio-Rad, EEUU). La visualización del gel obtenido se realizó mediante transiluminación con luz ultravioleta (UV) en un Chemi Doc XRS (Bio-Rad), que permite tanto la documentación gráfica como el análisis de los geles a través del programa Quantity One (Bio-Rad).

Una vez verificada la concentración óptima de los cebadores, se realizó la secuenciación de cada una de las regiones microsátélites por separado con el fin de asegurarnos la especificidad de los resultados obtenidos, verificando no sólo la correcta amplificación de la región de interés, sino, además, el tamaño real en pares de bases (pb) de dichas regiones. Para ello, una vez realizadas las PCR por separado de cada uno de los *loci*, los productos de amplificación fueron enviados al Servicio General de Investigación de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) (SGiker) donde se realizó la secuenciación de dichas regiones.

b. Ensayos para establecer diferencias en el efecto de la enzima polimerasa

Tras la optimización de la reacción múltiple incluyendo todos los cebadores para realizar la amplificación de todas las regiones microsátélites de interés, se ensayó el posible efecto de la actividad de la *Taq* polimerasa escogida con los resultados obtenidos.

En este ensayo se probaron tres combinaciones de solución tampón más *Taq* polimerasas (*mastermixes*) comerciales, cada una de ellas compuestas por ADN *Taq* polimerasas diferentes, pero todas ellas especialmente diseñadas y optimizadas para llevar a cabo protocolos de PCR múltiple. Cada una de las *mastermixes* fue probada en paralelo en las mismas condiciones de amplificación con mínimas adaptaciones según las necesidades de la polimerasa empleada (Tabla 3.4). Las *mastermixes* empleadas fueron:

1. TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version (Takara Bio Inc., Japón).
2. KAPA2G Fast Multiplex PCR kit (Kapa Biosystems, Inglaterra).

3. AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems Inc., EEUU).

Tabla 3.4. Reacciones de PCR con cada una de las combinaciones de *Taq* polimerasa (*mastermixes*) ensayadas.

TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version		KAPA2G Fast Multiplex PCR kit		AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	
Tampón <i>Ex Taq</i> 10X	2,5 µl	KAPA2G <i>Fast Multiplex Mix</i>	12,5 µl	Tampón <i>Gold</i> 10X	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl	Cebador <i>forward</i> (25µM)	0,2 µl (X4)	MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
Cebador <i>forward</i> (25µM)	0,2 µl (X4)	Cebador <i>reverse</i> (25µM)	0,2 µl (X4)	dNTPs (10 mM)	2 µl
Cebador <i>reverse</i> (25µM)	0,2 µl (X4)	ADN extraído (10 ng/µl)	2 µl	Cebador <i>forward</i> (25µM)	0,4 µl(X4)
ADN polimerasa	0,125 µl	BSA 100X	0,25 µl	Cebador <i>reverse</i> (25µM)	0,4 µl (X4)
ADN extraído (10 ng/µl)	2 µl	Agua de grado PCR	8,65 µl	ADN polimerasa (5U/ µl)	0,25 µl
BSA ¹ 100X	0,25 µl			ADN extraído (10 ng/µl)	2 µl
Agua de grado PCR	16,53 µl			BSA 100X	0,25 µl
				Agua de grado PCR	14,8 µl

¹BSA: *Bovine Serum Albumin* (Albumina de suero bovino).

Al igual que se hizo con la optimización de la concentración óptima de los cebadores, la verificación de la correcta amplificación de los fragmentos de PCR obtenidos tras la realización de las PCR múltiples con cada una de las combinaciones de *Taq* polimerasa ensayadas, se realizó mediante electroforesis de los productos de PCR obtenidos en geles de agarosa de baja EEO al 1% en TBE 1X a voltaje constante y posterior visualización y análisis del patrón electroforético en el sistema Chemi Doc XRS (Bio-Rad) de forma análoga a lo descrito con anterioridad.

c. Desarrollo del protocolo de amplificación *touchdown*

En la Figura 3.3 se describe de forma esquemática los protocolos de amplificación *touchdown* ensayados durante la optimización del protocolo de PCR.

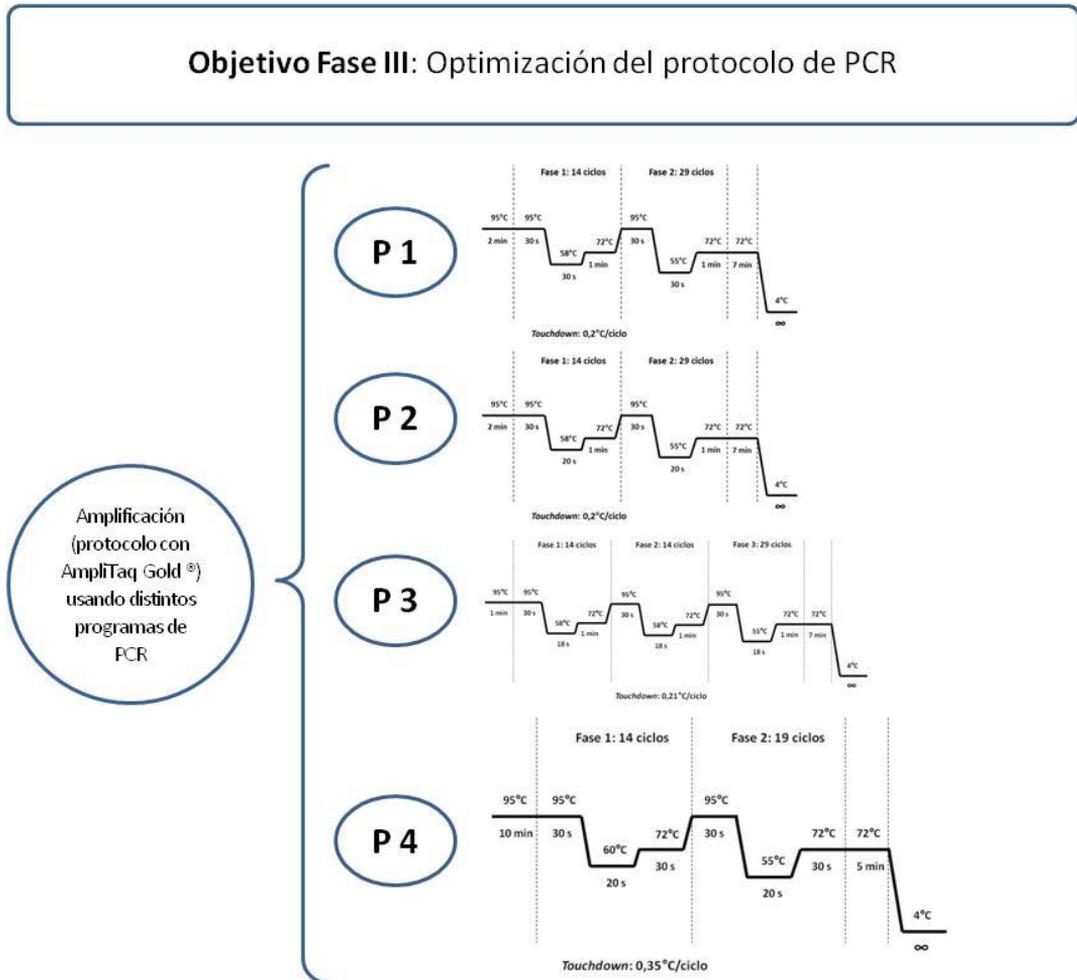


Figura 3.3. Esquema de los protocolos de amplificación *touchdown* ensayados.

El objetivo de esta fase fue aumentar la especificidad de los productos de PCR resultantes tras la amplificación, a fin de poder realizar un análisis fiable de los fragmentos obtenidos y poder estimar su tamaño con exactitud.

Dado que las temperaturas de hibridación de los cebadores estaban comprendidas entre 50,4 °C y 55,9 °C, los diseños de las reacciones de PCR tradicionales recomendaban una temperatura de hibridación excesivamente baja que, al menos teóricamente, permitiera la aparición de productos inespecíficos de amplificación fundamentalmente de aquellas parejas de cebadores con mayor temperatura de hibridación calculada. Con objeto de minimizar este problema se optó por desarrollar un protocolo de amplificación *touchdown*. Por tanto, se diseñaron y ensayaron cuatro protocolos de tipo *touchdown* dado que este tipo de esquema de amplificación permite que la temperatura de hibridación decrezca gradualmente hasta aproximarse a la temperatura de unión óptima de todos los cebadores (van Pelt-Verkuil et al., 2008).

La amplificación siguiendo cada uno de los cuatro protocolos (Figuras 3.4-3.7) con cada una de las combinaciones de *Taq* polimerasa escogidas (descrito en el apartado anterior) fueron realizadas en un termociclador C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad). El análisis del rendimiento se realizó mediante la visualización de los patrones electroforéticos obtenidos de manera análoga a lo descrito con anterioridad además de realizar un análisis de los fragmentos de PCR mediante electroforesis capilar.

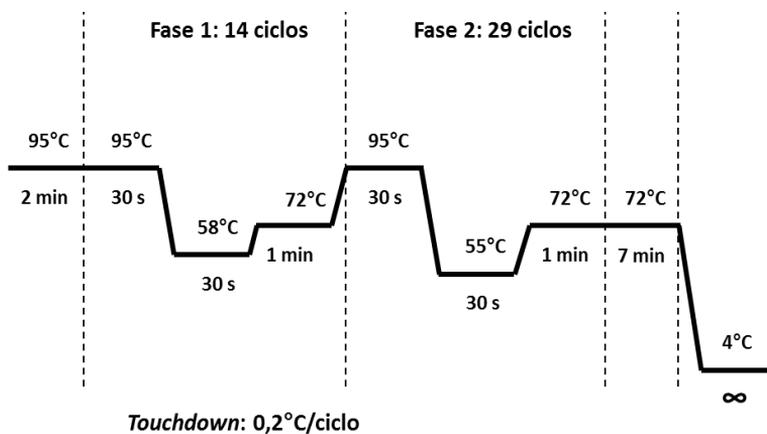


Figura 3.4. Protocolo *touchdown* 1.

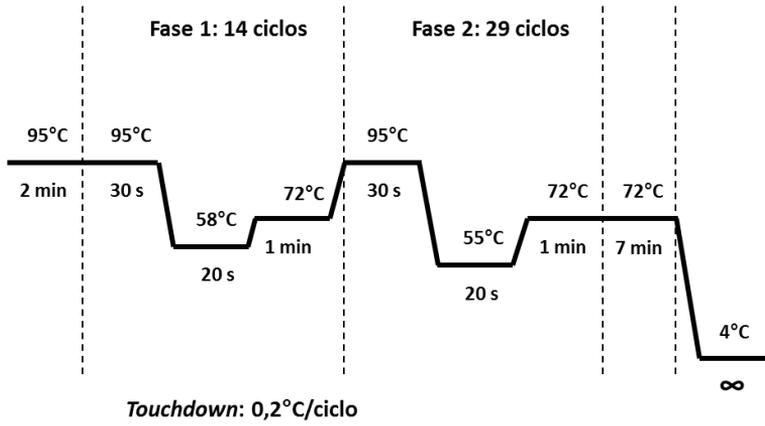


Figura 3.5. Protocolo *touchdown* 2.

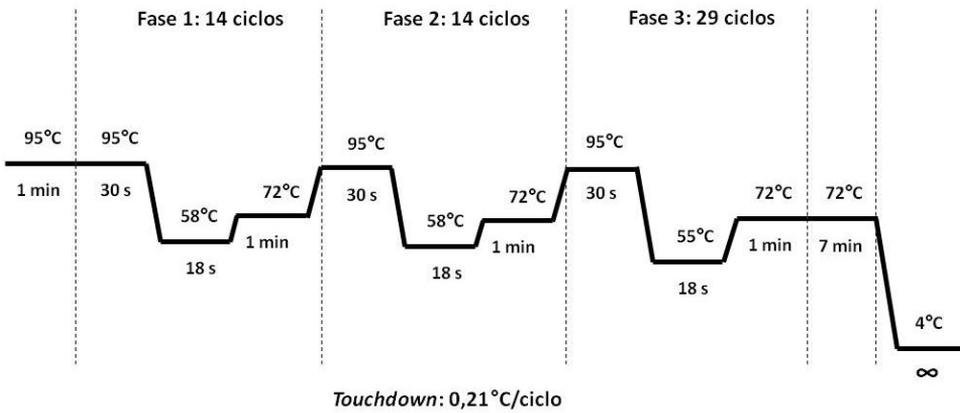


Figura 3.6. Protocolo *touchdown* 3.

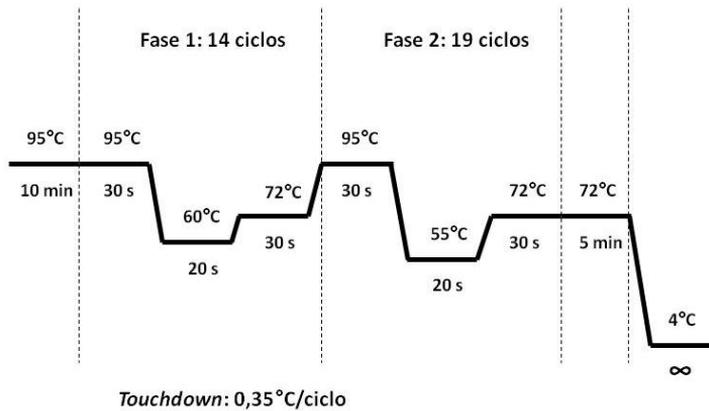


Figura 3.7. Protocolo *touchdown* 4.

Una vez comprobada la correcta amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa y la posterior visualización de los mismos, todos los productos de PCR fueron enviados al SGiker donde se llevó a cabo una electroforesis capilar. Para ello, se mezclaron 2 μl de cada producto de PCR obtenido con 8,7 μl de formamida de alta pureza (Hi-Di™ formamide, Applied Biosystems) y 0,3 μl de la matriz y marcador GenScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems). La mezcla fue desnaturalizada por calentamiento a 95 °C durante 5 min e inmediatamente enfriadas en hielo después para garantizar la completa separación de las hebras de cada fragmento de ADN obtenido.

La detección y separación de los productos amplificados se llevó a cabo por electroforesis capilar en el secuenciador ABI PRISM® 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) empleando un capilar de 36 cm de longitud y 16 peines y el polímero POP-7™ (Applied Biosystems) como soporte para la separación de los fragmentos. Para la detección de los fluorocromos con los que fueron marcados los cebadores empleados en la amplificación de los fragmentos (Tabla 3.2) se utilizó la matriz G5 (*Dye Set G5*). Las características físicas de la migración fueron las que por defecto indica el fabricante según el capilar, polímero y *dye set* empleado.

La detección y el análisis inicial de los resultados se llevó a cabo con el programa GeneMapper versión 3.5 (Applied Biosystems), realizándose la asignación alélica final de manera automática supervisada mediante el programa PeakScanner software versión 1.0 (Applied Biosystems). Los resultados se muestran en forma de electroferogramas donde cada pico representa un fragmento de PCR y cada uno de estos fragmentos tiene una motilidad dependiente de su peso molecular, que a su vez se corresponde con el número de repeticiones del marcador STR estudiado. A cada producto amplificado se le asigna su alelo correspondiente por comparación directa con el tamaño relativo de los aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto* definidos como cepas de referencia (*Candida parapsilosis sensu stricto* ATCC 22019 y ATCC MYA-4646-CDC317).

Para el estudio de las relaciones filogenéticas, llevado a cabo en los apartados 3.3 y 3.4, se consideraron que dos cepas eran genéticamente idénticas cuando presentaban la misma composición alélica para todos los marcadores estudiados, que dos cepas eran genéticamente diferentes cuando la combinación alélica fue diferente para más de uno de los *locus* estudiados y que dos cepas estaban relacionadas clonalmente cuando se constataron cambios mínimos en un único *locus* (diferencias >3 , ≤ 9), consideradas microvariaciones (Barbedo et al., 2015; Raquel Sabino et al., 2010).

Las relaciones filogenéticas entre los genotipos fueron visualizadas mediante la realización de un dendrograma usando la versión on-line del programa POPTREEW (Takezaki et al., 2014) empleando el algoritmo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

d. Valoración de la eficacia del nuevo protocolo

En la Figura 3.8 se describe de forma esquemática como se llevó a cabo la valoración de la eficacia del nuevo protocolo.

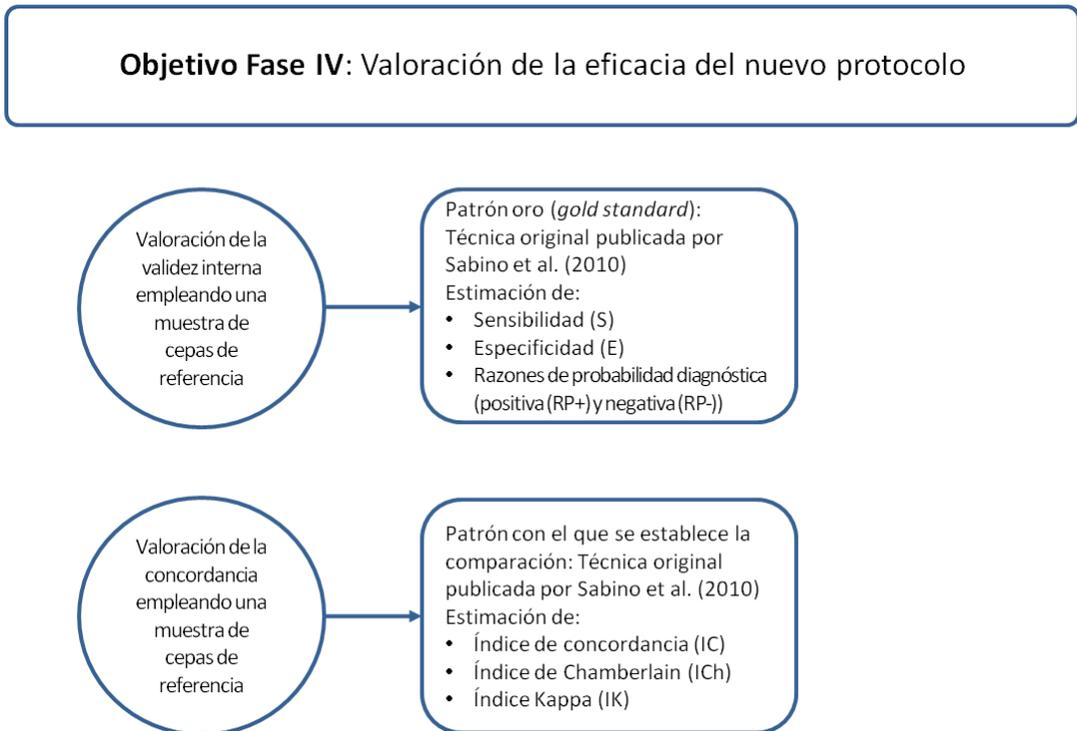


Figura 3.8. Esquema de la valoración de la eficacia del nuevo protocolo de PCR múltiple.

Para llevar a cabo la validación interna de la técnica propuesta, se compararon los resultados obtenidos tanto con el protocolo de PCR múltiple como con el protocolo descrito por Sabino y colaboradores en 2010, tomando este último como patrón oro¹.

Para la evaluación de una prueba diagnóstica, la manera más sencilla de representar los datos es mediante una tabla 2 x 2 (Tabla 3.5). Esta tabla permite el cálculo de diversos

¹ Esto implica que de todas las muestras ensayadas en las fases IV y V se obtuvo un genotipo empleando tanto el protocolo original basado en una reacción de PCR *singleplex* propuesta por Sabino y colaboradores (2010) como el protocolo adaptado en este trabajo de Tesis Doctoral basado en una reacción de PCR *multiplex*.

parámetros que resumen la validez interna de una prueba diagnóstica y que se encuentra determinada por la sensibilidad y especificidad de la misma (Cohen et al., 2016; Santabárbara-Serrano et al., 2016).

Así mismo, dicha tabla contiene el cálculo de las razones de probabilidad diagnóstica positiva y negativa que como puede apreciarse son parámetros derivados de los dos anteriores, pero con algún matiz de interpretación que se verá con posterioridad (Tabla 3.6).

Tabla 3.5. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la prueba patrón (Santabárbara-Serrano et al., 2016).

Resultado de la técnica	Técnica patrón o <i>gold standard</i>		
	Positivo (+)	Negativo (-)	Total
Positivo (+)	Verdaderos positivos (VP)	Falsos positivos (FP)	(VP+FP)
Negativo (-)	Falsos negativos (FN)	Verdaderos negativos (VN)	(FN+VN)
Total	(VP+FN)	(VN+FP)	(VP+FP+FN+VN)
Validez interna	$S = \frac{VP}{VP + FN}$	$E = \frac{VN}{VN + FP}$	
Razón de probabilidad	$RP+ = \frac{S}{1 - E}$	$RP- = \frac{E}{1 - S}$	

S: sensibilidad, E: especificidad, RP+: Razón de probabilidad positiva, RP-: Razón de probabilidad negativa.

Tabla 3.6. Parámetros estadísticos empleados para determinar la validez y seguridad de métodos diagnósticos.

Parámetro	Medida	Interpretación
Sensibilidad	Capacidad de la prueba para detectar la enfermedad.	$S = \frac{VP}{VP + FN}$
Especificidad	Capacidad de la prueba para descartar la enfermedad	$E = \frac{VN}{VN + FP}$
Valor predictivo positivo	Probabilidad de padecer la enfermedad, obteniéndose un resultado positivo en la prueba.	$\frac{VPP}{VP + FP}$
Valor predictivo negativo	Probabilidad de no padecer la enfermedad, obteniéndose un resultado negativo en la prueba.	$\frac{VPN}{VN + FN}$
Razón de probabilidad	Probabilidad de un resultado concreto según la presencia o ausencia de la enfermedad	$RP+ = \frac{S}{1 - E}$ $RP- = \frac{E}{1 - S}$

La valoración de la concordancia entre los dos métodos comparados se realizó mediante la estimación puntual y por intervalo del índice Kappa. De forma análoga, los resultados obtenidos con ambas técnicas fueron agrupados en tablas 2 x 2 con el objeto de facilitar su cálculo.

Para realizar el análisis y la interpretación del valor del índice kappa obtenido se empleó la escala propuesta por Landis y Koch que se recoge en la Tabla 3.7 (Landis & Koch, 1977).

Tabla 3.7. Valoración del índice Kappa.

Valor de Índice Kappa	Grado de concordancia
< 0,00	Pobre
0,00 - 0,20	Débil
0,21 - 0,40	Considerable
0,41 - 0,60	Moderado
0,61 - 0,80	Bueno
0,81 - 1,00	Muy bueno

Tanto los parámetros de evaluación de la validez interna de una prueba diagnóstica como el índice Kappa fueron calculados empleando el software estadístico Stata(R) v.12. (Material suplementario 8.2).

3.3. Estudios observacionales para verificar la efectividad y utilidad de la técnica propuesta (Objetivo 5).

- **Tipo de estudio**

Estudio retrospectivo de evaluación de prueba diagnóstica.

- **Técnica de muestreo empleada**

Muestreo de conveniencia.

- **Muestras empleadas**

Las dos cepas de referencia de *Candida parapsilosis* indicadas en el apartado 3.1 pertenecientes a la colección ATCC se emplearon como controles positivos. Además, se empleó agua de grado PCR (Roche Diagnostics) como control negativo en los diseños experimentales realizados durante esta fase.

Se estudiaron 76 aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto*, 38 obtenidos de hemocultivo y otros 38 del cultivo de la punta de catéter, aislados de 38 pacientes ingresados en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia durante los años 2010-2016 con sospecha de candidemia relacionada a catéter (CRC), a los cuales se les retiró el catéter. Los aislamientos clínicos con los que se llevó a cabo el estudio fueron gentilmente cedidos por los doctores Javier Pemán y Emilia Cantón del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

- **Diseño experimental**

Para verificar la efectividad y utilidad de la técnica propuesta como método de diagnóstico de CRC mediante estudios observacionales se llevaron a cabo las siguientes etapas:

- a. Procesamiento y cultivo convencional de las muestras.
- b. Identificación de las especies de *Candida* aisladas.

- c. Genotipificación mediante el nuevo protocolo de PCR múltiple basado en STR de aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto*.
- d. Valoración de la efectividad de la nueva técnica.
- e. Análisis de la información contenida en las regiones analizadas para la tipificación molecular.

a. Procesamiento de las muestras y cultivo de *Candida parapsilosis*

a.1. Procesamiento de las muestras

Para el estudio de la infección asociada a catéter se procedió al estudio de las muestras de sangre extraídas tanto a través de catéter sospechoso de infección como de una vía periférica. Además, si se decidía la retirada del catéter sospechoso, éste era remitido al laboratorio para el cultivo de la punta del mismo.

Los hemocultivos, independientemente del lugar de extracción de la sangre, se realizaron en el sistema automático BACTEC™ FX (Becton Dickinson, EEUU), mientras que las puntas de catéter fueron procesadas de acuerdo con lo establecido para los métodos semicuantitativo y cuantitativo de cultivo.

En el cultivo semicuantitativo de la punta del catéter propuesto por Maki y colaboradores en 1977, un segmento de catéter se rueda entre tres o cuatro veces sobre la superficie de una placa de agar sangre, con el fin de detectar la posible presencia de microorganismos en la superficie externa del mismo. Cuando en el cultivo crecen ≥ 15 unidades formadoras de colonias (UFC) por placa, se considera que hay una colonización del catéter (Bouza et al., 2004; Maki et al., 1977).

El método cuantitativo fue diseñado por Cleri y colaboradores en 1980; sin embargo, en 1987 Brun-Buisson y colaboradores propusieron una modificación del mismo que simplificó el método original. La técnica consiste en introducir un segmento de catéter en un tubo que contiene 1 ml de agua destilada estéril. Tras un minuto de agitación en un vórtex se siembran 0,1 ml de la suspensión en una placa de agar sangre. En este caso el punto de

corte para determinar la positividad de la prueba fue de $\geq 10^3$ UFC/ml (Bouza et al., 2004; Brun-Buisson et al., 1987; Cleri et al., 1980; Riboli et al., 2014).

a.2. Cultivo y aislamiento de *Candida parapsilosis*

Todos los aislamientos clínicos empleados en este estudio fueron obtenidos en el laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia de acuerdo con la metodología expuesta con anterioridad. Dichas levaduras fueron almacenadas en viales con agua estéril y enviados al Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la UPV/EHU donde se procedió a la identificación de la especie.

La identificación presuntiva de *Candida parapsilosis sensu lato* se realizó mediante la siembra de cada una de las muestras recibidas en los medios cromógenos ChromID Candida (bioMérieux) y Candida chromogenic agar (Laboratorios Conda, España) incubándose dichos medios durante 48 h a 37 °C (Figura 3.9). Las colonias con aspecto blanquecino o malva (morado pálido) de textura cremosa, identificadas de forma presuntiva como *Candida parapsilosis* fueron resembradas en agar glucosado de Sabouraud durante 24 h a 37 °C.

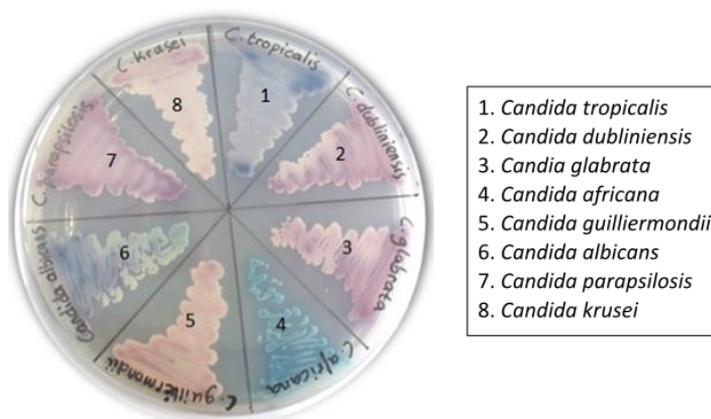


Figura 3.9. Crecimiento de ocho especies del género *Candida* en Candida chromogenic agar.

b. Identificación

b.1. Identificación fenotípica del complejo *Candida parapsilosis* mediante pruebas bioquímicas

La identificación definitiva se realizó empleando la galería bioquímica de asimilación de fuentes de carbono API ID 32C (bioMérieux) (Figura 3.10). La galería se compone de 32 cúpulas, de las cuales 29 contienen cada una un sustrato carbonado deshidratado y las tres cúpulas restantes, una es el control negativo, otra detecta la sensibilidad a la cicloheximida, y la última es una prueba colorimétrica para la esculina (Linares-Sicilia & Solís-Cuesta, 2007).

Brevemente, el procedimiento para realizar la identificación de la especie mediante esta técnica constaba de cinco pasos que se describen a continuación:

1. Se realizaba una suspensión de un cultivo puro de *Candida parapsilosis* en 2 ml de API Suspension Medium (bioMérieux), hasta obtener una suspensión homogénea con una densidad de 2,2 en la escala McFarland medida en un espectrofotómetro Densimat (bioMérieux).
2. Se transferían 250 μ l de la suspensión 2,2 McFarland en una ampolla API C medium como se indica en las instrucciones del fabricante y se homogeneizaba.
3. Se dispensaban 135 μ l de la suspensión celular obtenida, en cada una de las 32 cúpulas de la galería.
4. Se incubaba la galería a 30 °C durante 24-48 h.
5. Se realizaba la lectura automática con un lector mini API (bioMérieux): La lectura de las galerías se realizó tanto a las 24 como a las 48 h. El lector detecta en cada cúpula si hay crecimiento y transmite los datos al ordenador que muestra la identidad de la especie.

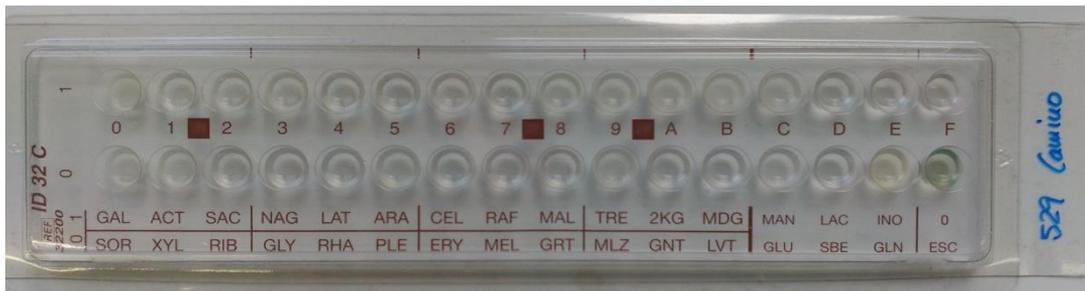


Figura 3.10. Galería bioquímica ID 32 C con *Candida parapsilosis sensu stricto*.

b.2. Extracción y purificación del ADN

Una vez identificados los aislamientos, se procedió a la extracción del ADN de todos los pertenecientes al complejo *Candida parapsilosis*. Para la extracción y purificación del ADN se partió de un cultivo de 24 h de *Candida parapsilosis* en agar glucosado de Sabouraud. La extracción se llevó a cabo con el kit comercial UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante (MoBio, EEUU). De manera resumida, el procedimiento de la extracción consistió principalmente en dos fases, una de lisis tanto térmica (calor) como mecánica y otra de aislamiento del ADN basada en la unión de este a la membrana de sílice de la que se componen las columnas empleadas en el kit.

Durante la fase de lisis las paredes celulares y las membranas del microorganismo se rompían combinando la acción del calor y de un detergente catiónico como el sodio-dodecil-sulfato (SDS), y la rotura mecánica con microesferas. Para ello, una suspensión de cada levadura se depositó por separado en un tubo con microesferas y una solución de lisis que contenía SDS como agente disruptivo. Con el propósito de aumentar el rendimiento de esta fase, los componentes celulares fueron lisados primero calentando dicha solución durante 10 min a 65 °C empleando un termobloque MB-102 (BIOER, China) con agitación a 750 rpm, para después continuar con una lisis mecánica en un vórtex estándar a máxima velocidad durante 10 min.

Una vez obtenido el material resultante tras la lisis, se procedió al aislamiento del ADN en suspensión. Para ello se realizaron los siguientes pasos: 1) precipitación de proteínas y otros componentes celulares, 2) unión del ADN liberado a la membrana de sílice de las columnas, 3) lavado de los ácidos nucleicos presentes en la muestra y 4) elución final del ADN purificado en una solución tampón que contiene Tris 10 mM a pH 8. El producto de elución obtenido fue congelado a -20 °C hasta su uso posterior.

b.3. Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría

Previamente a la amplificación del ADN obtenido se cuantificó su concentración en cada una de las muestras a estudiar con el espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, EEUU). Este método se basa en la determinación de la absorción de luz ultravioleta (UV) por parte de las bases nitrogenadas que conforman los ácidos nucleicos, realizándose medidas de absorbancia a diferentes longitudes de onda. La lectura a 260 nm (A_{260}) corresponde a la máxima absorbancia de los ácidos nucleicos y nos permite calcular la concentración de los mismos en la muestra expresándola en ng/ml. Por el contrario, la lectura a 280 nm (A_{280}) corresponde a la máxima absorbancia de las proteínas y la realizada a 230 nm (A_{230}) refleja la máxima absorbancia de los solventes orgánicos.

El espectrofotómetro además de proporcionar valores de concentración también permite obtener valores de relación ADN/proteínas (A_{260}/A_{280}) así como ADN/solventes orgánicos (A_{260}/A_{230}), lo que aporta información adicional de la pureza del ADN (mediante la estimación del cociente A_{260}/A_{280}) y la contaminación de la muestra de ADN por solventes orgánicos como fenol, carbohidratos etc. (mediante el cálculo del cociente A_{260}/A_{230}). La interpretación de ambos cocientes se realiza considerando las siguientes premisas:

1. Un ADN de gran pureza tendrá valores en torno a 1,8-2.
2. Se considera que un ADN sufre contaminación por solvente orgánicos cuando los valores para el cociente A_{260}/A_{230} son superiores a 0,5.

b.4. Identificación molecular de *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*

La identificación del complejo *Candida parapsilosis* se realizó mediante métodos moleculares basados en la PCR. Los aislamientos fueron caracterizados mediante el protocolo de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) descrito previamente tanto por Tavanti y colaboradores (2005) como por Miranda-Zapico y colaboradores (2011). La reacción de PCR consistió en la amplificación de un fragmento de 716 pb del gen *SADH* que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa secundaria. El protocolo desglosado con cada una de sus etapas se describe a continuación.

- **Protocolo de amplificación**

La reacción de amplificación PCR-RFLP incluía una combinación comercial de solución tampón, enzima *Taq* polimerasa, $MgCl_2$ y desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Biomix[®]) (Bioline), a la que se añadía la pareja de cebadores: S1F (5'-TTGATGCTGTTGGATTGT-3') y S1R (5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3'). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l y el contenido de la mezcla era el siguiente:

Biomix [®]	12,5 μ l
Cebador <i>Forward</i> S1F (10 μ M) (IDT)	1 μ l
Cebador <i>Reverse</i> S1R (10 μ M) (IDT)	1 μ l
ADN extraído (10 ng/ μ l)	2 μ l
Agua de grado de PCR	10,63 μ l

En cada tanda de reacciones realizadas se utilizaron un control negativo (agua de grado de PCR) y los controles positivos indicados en el apartado 3.2.

- **Condiciones de amplificación**

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador convencional C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) y el programa de PCR consistió en:

1. Desnaturalización inicial	95 °C, 5min	
2. Desnaturalización	92 °C, 1 min	X 35 ciclos
3. Hibridación	45 °C, 1 min	
4. Extensión	68 °C, 1 min	
5. Extensión final	68 °C, 10 min	
6. Enfriamiento	4 °C, ∞	

- **Digestión de los productos de PCR**

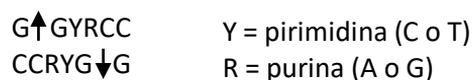
Tras la amplificación del gen *SADH*, los productos de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *BanI* (New England Biolabs, EEUU). La suspensión utilizada en la reacción de digestión, cuyo volumen final fue de 28 µl tenía la siguiente composición:

Producto de PCR (amplicón <i>SADH</i>)	25 µl
CutSmart Buffer	2,5 µl
<i>BanI</i> (5U/µl)	0,25 µl

- **Electroforesis e interpretación de los resultados**

Los fragmentos generados tras la digestión al igual que en apartados anteriores, se separaron en base a su relación masa-carga mediante una electroforesis convencional en gel de agarosa de baja EEO al 1,5% en TBE 1X.

La diferenciación de los aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis* se basó en el número de sitios de restricción que presentaban los amplicones de *SADH* tras su digestión con *BanI*. La secuencia reconocida por esta enzima es:



Esta enzima tiene un sitio de restricción para *Candida parapsilosis sensu stricto* (generado un fragmento de 196 pb) y tres sitios de restricción para *Candida metapsilosis* que generan tres fragmentos con longitudes de 96, 469 y 529 pb. A diferencia de las otras dos especies, *Candida orthopsilosis* carece de sitio de restricción alguno (Figura 3.11).

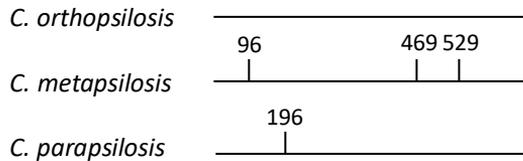


Figura 3.11. Puntos de corte con la enzima *BanI* en amplicón *SADH* (modificado de Tavanti et al., 2007).

En la Figura 3.12 se resume gráficamente el protocolo de identificación molecular por RFLP-PCR.

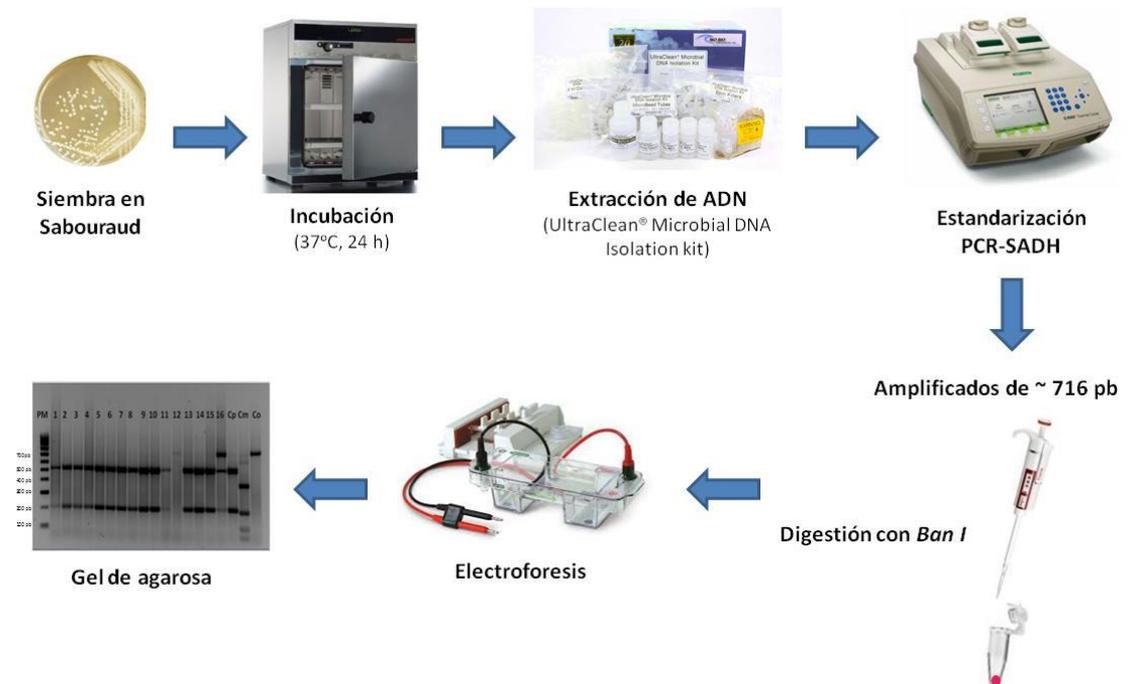


Figura 3.12. Método de identificación molecular por PCR-RFLP.

Identificación mediante secuenciación

En todos aquellos aislamientos cuya identificación no fue concluyente, ya fuera porque el patrón de bandas PCR-RFLP fuese ambiguo o porque los resultados obtenidos con los medios cromógenos y la galería bioquímica ID 32C no coincidían con la identificación molecular, se procedió a la identificación mediante secuenciación de dichas muestras.

Para ello, se realizó una PCR convencional de la región intragénica del gen 28S ARNr comprendida entre los cebadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y posterior secuenciación para la identificación definitiva (Miranda-Zapico et al., 2011).

- **Protocolo de amplificación**

La reacción de amplificación de la región ITS incluye una *mastermix* comercial (Biomix[®], Bioline), que contiene una solución tampón a una concentración 10X, MgCl₂, dNTPs y una *Taq* ADN polimerasa a la cual se añadió la pareja de cebadores ITS1 e ITS4.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 30 µl y su contenido era el que se indica a continuación:

Biomix [®]	12 µl
Cebador ITS1 (10 µM) (IDT)	1,2 µl
Cebador ITS4 (10 µM) (IDT)	1,2 µl
AND extraído (10 ng/µl)	2 µl
Agua de grado de PCR	15,6 µl

- **Condiciones de amplificación**

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador convencional C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) y las condiciones fueron las siguientes:

1. Desnaturalización inicial	95 °C, 5min	X 30 ciclos
2. Desnaturalización	95 °C, 1 min	
3. Hibridación	60 °C, 30 s	
4. Extensión	72 °C, 1 min	
5. Extensión final	72 °C, 10 min	
6. Enfriamiento	4 °C, ∞	

- **Electroforesis e interpretación de los resultados**

Una vez comprobada la correcta amplificación de las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa de baja EEO al 1% en TBE 1X (Tris-borato EDTA), a voltaje constante (90 V/cm) durante 80 min, los productos de PCR fueron enviados SGiker, donde fueron secuenciados. A continuación, las secuencias obtenidas fueron analizadas en los programas informáticos Bioedit y ClustalX (Figura 3.13) que permiten el alineamiento de secuencias nucleotídicas para la identificación de diferencias en las secuencias de las tres especies de *Candida parapsilosis sensu lato*. Una vez analizadas las secuencias, la identificación de las especies crípticas que conforman el complejo *Candida parapsilosis* se llevó a cabo mediante la comparación entre parejas de secuencias usando la plataforma BLAST del NCBI (Figura 3.14) (Disponible en: www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

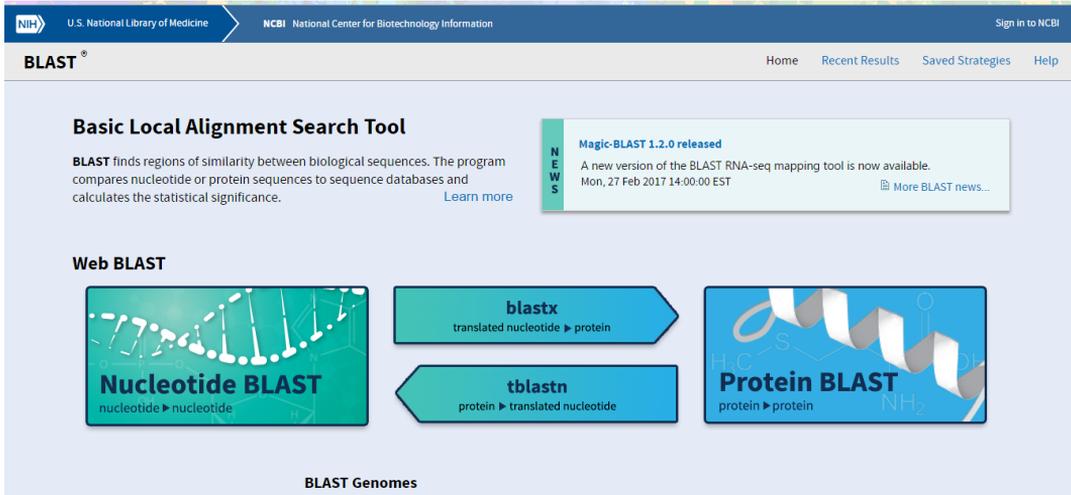


Figura 3.13. Programa de análisis de secuencias Bioedit.



Figura 3.14. Imagen del algoritmo BLAST del NCBI www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

d. Valoración de la efectividad de la nueva técnica.

En la Figura 3.15 se describe de forma esquemática como se realizó la valoración de la efectividad de la técnica con aislamientos clínicos de sangre.

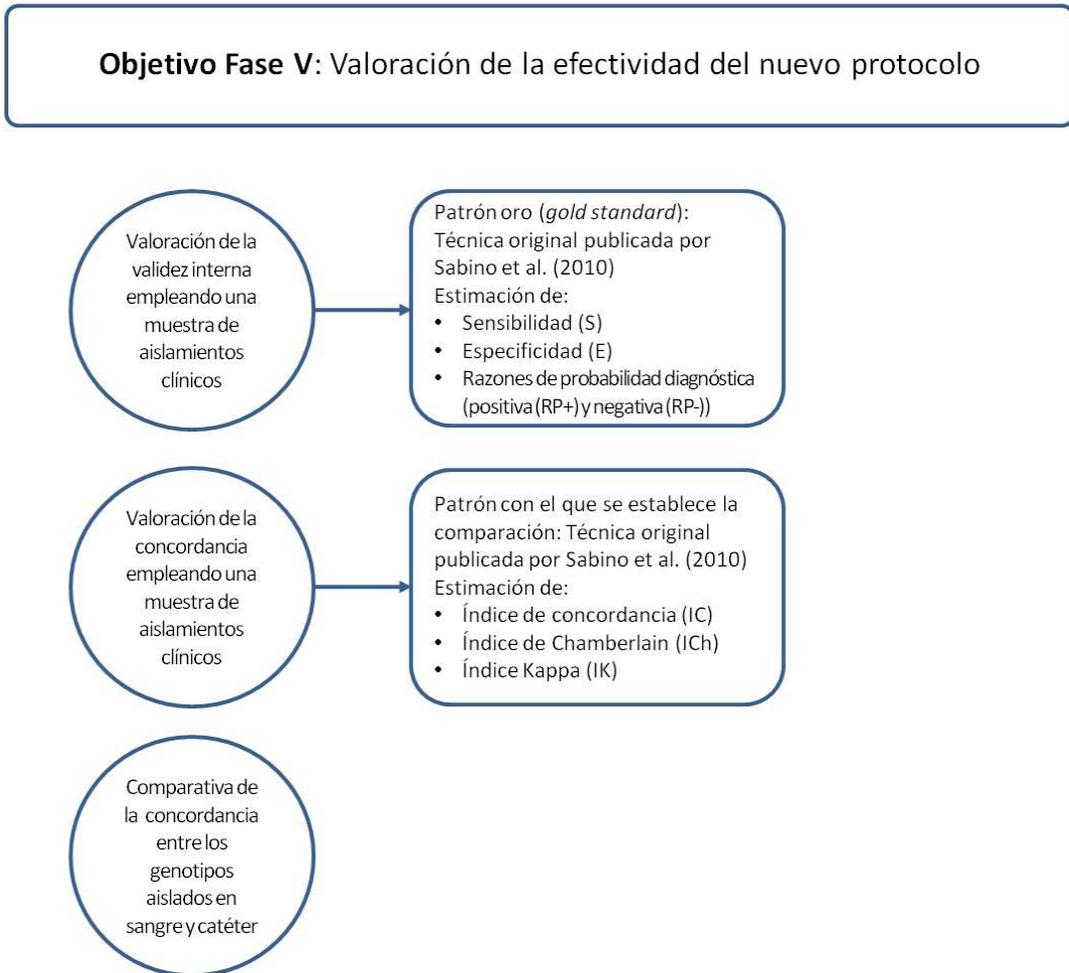


Figura 3.15. Esquema de valoración de la efectividad de la técnica empleando aislamientos clínicos.

Para la valoración de la efectividad del nuevo protocolo de PCR múltiple se emplearon aislamientos clínicos, con el fin de reproducir unas condiciones lo más cercanas posibles a la realidad diagnóstica de un laboratorio de Microbiología Clínica. La metodología empleada

fue análoga a la descrita en el apartado de valoración de la eficacia del nuevo protocolo empleando en ese caso muestras de referencia.

En este caso además de la validación interna y el nivel de concordancia también se llevó a cabo la validación externa del nuevo protocolo como técnica diagnóstica de CRC mediante la estimación de los valores predictivos positivo y negativo (Cohen et al., 2016; Santabárbara-Serrano et al., 2016). Dichos valores se definen respectivamente como la probabilidad de que una prueba positiva diagnostique correctamente a una persona que padece la enfermedad que diagnostica la técnica, para el caso del VPP y como la probabilidad de que una prueba negativa diagnostique correctamente a un individuo que no padece dicha enfermedad en caso de tratarse del VPN. Ambos valores son de utilidad en clínica ya que se ven afectados por la prevalencia de la enfermedad (en nuestro caso la candidemia asociada a catéter) en la población de estudio. Así el VPP disminuye conforme lo hace la prevalencia de la enfermedad (Tabla 3.8). La estimación de este efecto en el presente trabajo se realizará conforme el método de máxima verosimilitud empleando para ello el programa estadístico Stata® v. 12.

Tabla 3.8. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la prueba patrón (Santabárbara-Serrano et al., 2016).

Resultado de la técnica	Técnica patrón o <i>gold standard</i>			Validez externa
	Positivo (+)	Negativo (-)	Total	
Positivo (+)	VP	FP	VP+FP	$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$
Negativo (-)	FN	VN	FN+VN	$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$
Total	VP+FN	VN+FP	VP+FP+FN+VN	
Validez interna	$S = \frac{VP}{VP + FN}$	$E = \frac{VN}{VN + FP}$		
Razón de probabilidad	$RP+ = \frac{S}{1 - E}$	$RP- = \frac{E}{1 - S}$		

VP: valor predictivo, FP: falso positivo, FN: falso negativo, VN: verdadero negativo, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, S: sensibilidad, E: especificidad, RP+: razón de probabilidad positiva, RP-: razón de probabilidad negativa.

e. Análisis de la información contenida en las regiones analizadas para la tipificación molecular

El carácter informativo de los marcadores STR varía en función de los loci y la población estudiada, y depende principalmente del número de alelos y sus frecuencias (Reyes-Valdés, 2013). Por ello, para el análisis estadístico de estudios que incluyen información de marcadores polimorfos, como es el caso de los STR, es importante conocer una serie de parámetros estadísticos relacionados con la genética de poblaciones que permiten determinar la eficacia de los marcadores genéticos seleccionados (Butler, 2010).

Los parámetros más comunes derivados de datos genotípicos son (Resumen en la Tabla 3.9):

- Frecuencias alélicas. Proporción relativa de un alelo específico respecto al conjunto de alelos que pueden ocupar un *locus* determinado en una población dada. Se calcula dividiendo el número de alelos iguales en una población entre el número total de alelos identificados (Butler, 2010).
- Índice de homocigosidad (h). Número de individuos homocigóticos para un determinado locus en el total de la población (Nei, 1978).

$$h = \frac{n_i}{N_i}$$

Donde $\begin{cases} n_i = \text{número de individuos homocigóticos analizados} \\ N_i = \text{número total de genotipos analizados} \end{cases}$

- Análisis de heterocigosidad (HET). Representa la probabilidad de que dos alelos del mismo *locus* tomados al azar en una población sean distintos.

Heterocigosidad observada (HET_{obs}). Es la proporción de individuos heterocigotos observada en una población determinada (Nei, 1978).

$$HET_{obs} = \frac{n_i}{N_i}$$

Donde $\begin{cases} n_i = \text{número de individuos homocigóticos analizados} \\ N_i = \text{número total de genotipos analizados} \end{cases}$

Heterocigosidad esperada (HET_{esp}). Es la proporción de heterocigotos que se esperaría encontrar si la población se encontrase en equilibrio. Cuando el número de *loci* no es elevado, ni están tomados al azar, este valor no sería indicativo de variabilidad genética real, aunque sí que tendrían validez para conocer la estructura de la población y realizar comparaciones entre poblaciones (Nei, 1978).

$$HET_{esp} = 1 - \sum p_i$$

Donde $\begin{cases} p_i = \text{frecuencia génica del alelo } i \text{ de un locus para varios alelos} \\ \text{en la población} \end{cases}$

- Contenido de información polimorfa (PIC). Similar al valor de heterocigosidad, este índice evalúa la información de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos. Valores mayores de 0,5 se consideran muy informativos, entre 0,25 y 0,5 medianamente informativos y menores de 0,25 poco informativos (Botstein et al., 1980).

$$PIC = 1 - (\sum p_i^2) - \sum \sum p_i \times p_j$$

Donde $\begin{cases} p_i = \text{frecuencia del alelo } i \text{ para el locus estudiado} \\ p_j = \text{frecuencia del alelo } (i + 1) \end{cases}$

- Poder de discriminación (PD). Determina la probabilidad de que un marcador o conjunto de marcadores sean capaces de diferenciar genéticamente a individuos no relacionados y tomados al azar. Se calcula de acuerdo al índice de Diversidad de Simpson (Desmarais et al., 1998; Sabino et al., 2010).

$$PD = 1 - \frac{1}{N \times (N - 1)} \times \sum_{j=1}^s n_j \times (n_j - 1)$$

Donde $\left\{ \begin{array}{l} N = \text{número de aislamientos clínicos totales} \\ s = \text{número de aislamientos clínicos con diferente genotipo} \\ n_j = \text{número de aislamientos clínicos con genotipo } j \end{array} \right.$

Un PD igual a 1 indica que los *loci* utilizados permiten diferenciar todos los aislados de la población estudiada, mientras que un PD con valor nulo determina que todos los aislados estudiados pertenecen al mismo genotipo.

Tabla 3.9. Parámetros estadísticos más comunes derivados de datos genotípicos.

Parámetro	Medida	Interpretación	Cita bibliográfica
Contenido de información polimorfa (PIC)	Información de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias alélicas	$PIC = 1 - (\sum p_i^2) - \sum \sum 2p_i^2 \cdot p_j^2$ > 0,5 muy informativo 0,25-0,5 medianamente informativos < 0,25 poco informativo	Botstein et al., 1980 Reyes-Valdés, 2013
Índice de diversidad de Simpson (PD)	Probabilidad de que un marcador sea capaz de diferenciar genéticamente a individuos no relacionados tomados al azar	$PD = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$ PD = 1 Todos los aislamientos de la población pueden ser diferenciados PD = 0 Todos los aislamientos estudiados pertenecen al mismo genotipo	Hunter, 1990 Desmarais et al., 1998 Reyes-Valdés, 2013
Índice de heterocigosidad (HETObs)	Probabilidad de que dos alelos del mismo locus tomados al azar sean distintos	$HETObs = \frac{n_i}{N_i}$ ni: número de individuos heterocigotos Ni: Total de individuos	Nei, 1978
Entropía	Cálculo de la información de los marcadores estudiados en el marco de la teoría de la información	$H(M) = - \sum_{i=1}^g p_i \log_2 p_i$	Shannon, 2001 Reyes-Valdés, 2013

3.4. Estudios observacionales para verificar la efectividad y utilidad de la técnica propuesta (Objetivo 6).

- **Tipo de estudio**

Estudio observacional prospectivo de aplicación clínica para valorar el estudio de relaciones filogenéticas entre aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto*.

- **Técnica de muestreo empleada**

Se realizó un muestreo de conveniencia que se componía de todos los episodios de candidiasis invasiva recogidos durante los años 2009-2010 en los hospitales españoles participantes en el estudio FUNGEMYCA.

- **Muestras empleadas**

Se emplearon las dos cepas de referencia de *Candida parapsilosis* indicadas en el apartado 3.2 pertenecientes a la colección ATCC. Además, se empleó agua de grado PCR (Roche Diagnostics) como control negativo en los diseños experimentales realizados durante esta fase.

Se emplearon 297 aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* pertenecientes a pacientes que participaron en el estudio multicéntrico FUNGEMYCA realizado en España entre enero de 2009 y febrero de 2010.

- **Diseño experimental**

Con el objetivo de verificar la efectividad y utilidad de la técnica propuesta para su aplicación en el estudio de relaciones filogenéticas se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- a. Identificación y genotipificación de aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto*.
- b. Comparación y relación de los genotipos aislados en las diferentes Comunidades Autónomas (CCAA).

- c. Análisis de la información contenida en los marcadores de microsatélites analizados en las distintas regiones.

b. Comparación y relación de los genotipos aislados en las diferentes CCAA

En la Figura 3.16 se esquematiza como se realizó la aplicación clínica del protocolo de PCR múltiple mediante STR al estudio de relaciones filogenéticas.



Figura 3.16. Esquema de la valoración de las relaciones filogenéticas.

Una vez identificados los genotipos presentes en las diferentes CCAA participantes en el estudio, se procedió a realizar el estudio de las relaciones filogenéticas existentes entre los distintos genotipos. Para ello se realizaron dendrogramas con la versión *on-line* del programa POPTREEW (Takezaki et al., 2014) usando el algoritmo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) de manera análoga al realizado en el apartado 3.3.

La comparación de los genotipos se realizó atendiendo a las características de los pacientes, así como posibles factores asociados tales como:

- Comunidad autónoma de procedencia
- Producción de biopelículas por los aislamientos clínicos

- Patrón de sensibilidad a los fármacos antifúngicos de los aislamientos clínicos
- **Producción de biopelículas**

Existen diversos métodos que permiten detectar y evaluar la producción de biopelículas como pueden ser el crecimiento en placa, en tubo, ensayo de bioluminiscencia, examen al microscopio de fluorescencia o el método en Agar rojo Congo (ARC) (Saxena et al., 2014).

En este trabajo se empleó el método en agar rojo Congo, por su sencillez técnica, rapidez y buena sensibilidad como técnica de cribado para la valorar la producción de biopelículas en todas las cepas identificadas como *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis*.

Basándonos en el método modificado establecido para los estafilococos coagulasa-negativos, el ARC está compuesto por medio sólido de infusión cerebro corazón (*Brain Heart Infusion* –BHI-) (Laboratorios Conda), suplementado con glucosa (Panreac Applichem, España) y rojo Congo (Sigma-Aldrich, EEUU) tal y como se indica a continuación:

Solución rojo Congo:

Rojo Congo	0,8 g/l
Agua destilada	50 ml

Solución glucosa:

Glucosa	80 g/l
Agua destilada	150 ml

Agar rojo congo (ARC):

BHI	37 g/l
Agar bacteriológico	10 g/l
Agua destilada	800 ml
Solución rojo Congo	50 ml
Solución glucosa	150 ml

El rojo Congo y la glucosa fueron preparados y concentrados en una solución acuosa por separado del resto de los componentes. Tanto la solución de rojo Congo como la mezcla de

BHI y agar bacteriológico fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 min, mientras que la solución acuosa de glucosa se añadió al resto de los componentes del medio esterilizada por filtración con un filtro millipore de 0,20 µm (Sarstedt, Alemania) cuando el agar estaba en torno a 55 °C. Una vez solidificado el agar en placas de Petri, se inocularon los aislamientos mediante agotamiento y se incubaron en aerobiosis durante 24-48 h a 37 °C (Saxena et al., 2014).

Los aislamientos clínicos productores de biopelícula crecen formando colonias negras o rojas, mientras que los que presenten una producción débil desarrollan colonias de un color rosa con el centro ocasionalmente negro. Las colonias de los aislamientos que no producen biopelículas son de aspecto blanquecino o rosa muy claro (Figura 3.17) (Saxena et al., 2014).



Figura 3.17. Colonias con y sin capacidad productora de biopelículas en ARC.

- **Estudio de la sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos**

Se analizó la sensibilidad in vitro de todos los aislamientos clínicos identificados como *Candida parapsilosis sensu stricto* a los fármacos antifúngicos del grupo de las equinocandinas: anidulafungina (Pfizer), caspofungina (Merck, Sharp & Dohme, EEUU) y micafungina (Astellas Pharma, EEUU).

El estudio de la sensibilidad in vitro a las equinocandinas se realizó siguiendo el método estandarizado de microdilución en caldo RPMI propuesto por el CLSI en el documento M27-

A3 (CLSI, 2008), utilizaron los puntos de corte establecidos para *Candida parapsilosis* propuestos por el CLSI en el documento M27-A3 y el suplemento M27-S4 (CLSI, 2008, 2012) (Tabla 3.10). La cepa *Candida parapsilosis* ATCC 22019 se utilizó como control.

Tabla 3.10. Puntos de corte clínicos de las equinocandinas para *Candida parapsilosis* (CLSI M27-S4, 2012).

Fármacos antifúngicos	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)		
	Sensible	SDD ¹	Resistente
Anidulafungina	≤2	4	≥8
Caspofungina	≤2	4	≥8
Micafungina	≤2	4	≥8

¹SDD, sensible dosis dependiente.

Una vez determinados los valores de CMI, se estudió la sensibilidad reducida in vitro a las equinocandinas por la presencia de mutaciones en las regiones *Hot Spot* HS1 y HS2 en los genes *FKS1* y *FKS2*. El estudio se llevó a cabo mediante secuenciación siguiendo el método propuesto por García-Effron y colaboradores y Martí-Carrizosa y colaboradores (García-Effron et al., 2008; Martí-Carrizosa et al., 2015). Las secuencias nucleotídicas y aminoácidas obtenidas fueron comparadas con las secuencias de referencia depositadas en la base de datos GenBank, cuyos números de acceso de las secuencias de cada gen son: EU221325 (*Candida parapsilosis*, *FKS1*) y EU221326 (*Candida parapsilosis*, *FKS2*).



RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Valoración de la eficacia de un protocolo de PCR múltiple para la genotipificación mediante STR

a. Ensayos de optimización del conjunto de cebadores y componentes de la PCR

Siguiendo la metodología propuesta en el apartado 3.2 y tras amplificar mediante reacciones de PCR *singleplex* cada *locus*, se ensayaron cada una de las parejas de cebadores y las combinaciones descritas en reacciones de PCR múltiples a diferentes concentraciones que oscilaron entre 0,2 μM y 0,5 μM . La elección de la concentración óptima de los cebadores se determinó en base a la visualización de la intensidad de las bandas de los productos de PCR específicos y de la ausencia de productos de amplificación inespecíficos. Los resultados obtenidos determinaron que la concentración final óptima de cada cebador empleado en la reacción de PCR múltiple era de 0,4 μM . A esta concentración todos los productos obtenidos en la reacción de PCR múltiple presentaban la misma intensidad de banda. Se observó una disminución en el producto de amplificación de B5 (disminución en la intensidad de bandas obtenidas) cuando la concentración de los cebadores que amplifican esta región se encontraba por debajo de la concentración óptima. Así mismo, se comprobó que empleando concentraciones superiores a la óptima (0,5 μM) la intensidad de las bandas era superior y más uniforme entre los distintos cebadores. Sin embargo, se detectó un aumento significativo de bandas inespecíficas, por lo que finalmente se decidió desechar esta opción (Figuras 4.1 y 4.2).

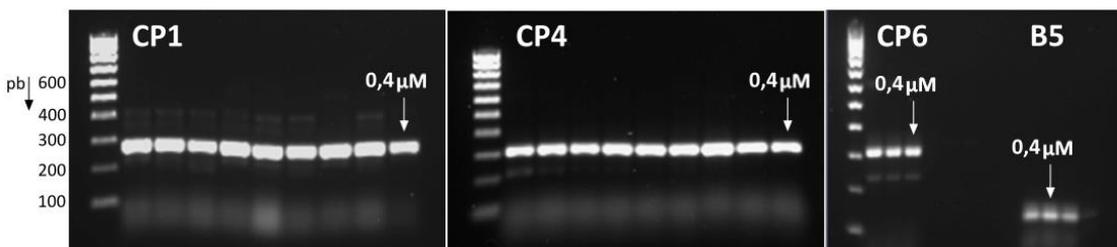


Figura 4.1. Reacciones *singleplex* de los cuatro *loci* a diferentes concentraciones.

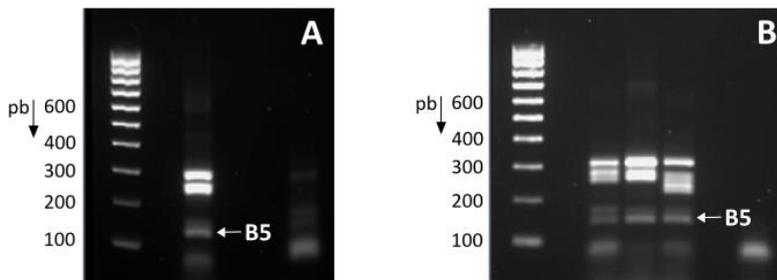


Figura 4.2. PCR múltiple con las cepas de referencia. Cebadores a 0,2 μM (A) y cebadores a 0,4 μM (B).

Una vez verificada la concentración óptima de los cebadores, se realizó la secuenciación de cada una de las regiones microsatélites que verificó tanto la correcta amplificación de la región de interés como el tamaño en pares de bases (pb) de dichas regiones.

b. Ensayos para establecer diferencias en el efecto de la enzima polimerasa

La elección de la enzima polimerasa se basó en la visualización de geles de agarosa y el análisis de fragmentos en los que se evaluó tanto el ruido de fondo como la altura de los picos del electroferograma obtenido. Los resultados tras el análisis de patrón electroforético empleando el kit con la *Taq* polimerasa TaKaRa Ex TaqTM Hot Start Version, revelaron que la intensidad de los productos de PCR obtenidos era variable. Los perfiles obtenidos en el análisis de fragmentos mostraron la presencia de picos inespecíficos y artefactos que dificultaban la interpretación de los resultados. Incluso, se observó la presencia de productos de amplificación (resultados falsos positivos) tanto con las 11 cepas genéticamente relacionadas como con el control negativo (Figura 4.3).

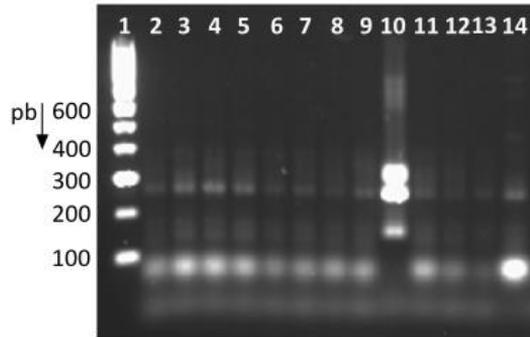


Figura 4.3. PCR múltiples realizadas con la enzima *Taq* polimerasa TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version en 11 cepas genéticamente relacionadas con *Candida parapsilosis sensu stricto*. Calles: 1. Marcador de peso molecular, 2. *Candida guilliermondii*, 3. *Candida glabrata*, 4. *Candida bracariensis*, 5. *Candida africana*, 6. *Candida albicans*, 7. *Candida krusei*, 8. *Candida nivariensis*, 9. *Candida dubliniensis*, 10. *Candida parapsilosis*, 11. *Candida metapsilosis*, 12. *Candida orthopsilosis*, 13. *Candida tropicalis* y 14. Control negativo.

Los resultados obtenidos con la enzima KAPA2G Fast Multiplex PCR kit fueron similares a los obtenidos con el kit de Takara, constatándose la presencia de bandas adicionales tanto en la muestra de control negativo, como en las cepas genéticamente relacionadas (Figura 4.4).

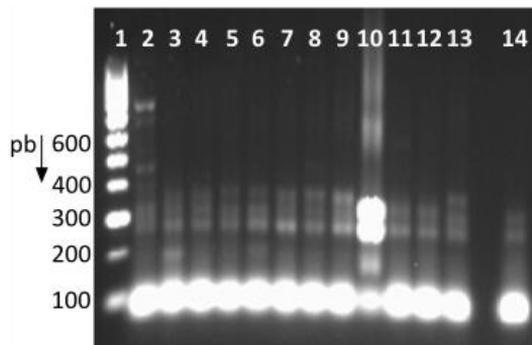


Figura 4.4. PCR múltiple realizada con la enzima KAPA2G Fast Multiplex PCR kit en 11 cepas genéticamente relacionadas con *Candida parapsilosis sensu stricto*. Calles: 1. Marcador de peso molecular, 2. *Candida guilliermondii*, 3. *Candida glabrata*, 4. *Candida bracariensis*, 5. *Candida africana*, 6. *Candida albicans*, 7. *Candida krusei*, 8. *Candida nivariensis*, 9. *Candida dubliniensis*, 10. *Candida parapsilosis*, 11. *Candida metapsilosis*, 12. *Candida orthopsilosis*, 13. *Candida tropicalis* y 14. Control negativo.

En la Figura 4.5 se muestra un gel de agarosa para comparar los resultados de la PCR múltiple llevada a cabo con las enzimas TaKaRa® Ex Taq Hot Start Version y KAPA 2G Fast Multiplex PCR kit. Los cuatro productos de PCR amplificados con la *Taq* polimerasa de Takara presentaban un patrón electroforético de bandas con intensidades similares pero menores a la obtenidas con la enzima del kit de KAPA, lo que convierte en teoría a esta última enzima como la más eficiente de ambas. Sin embargo, la enzima KAPA generó bandas inespecíficas en la muestra del control negativo (C).

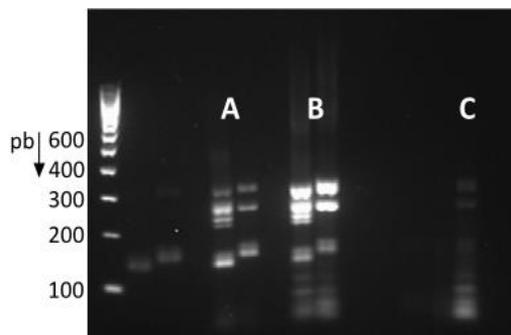


Figura 4.5. PCR múltiple realizada con la enzima TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version (A) y la enzima KAPA2G Fast Multiplex PCR kit (B). Control negativo con la enzima de KAPA (C).

Por último, se evaluó la actividad de la enzima AmpliTaq Gold® DNA Polymerase. Los resultados obtenidos tras el análisis del patrón observado en los geles de agarosa mostraron que todos los *loci* presentaban bandas con la misma intensidad, pero era menor que las observadas con las dos enzimas descritas anteriormente (Figura 4.6). Sin embargo, a pesar de que los resultados obtenidos en el análisis visual de los geles de agarosa eran más desfavorables a priori, los electroferogramas obtenidos en el análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar mostraron perfiles con menor ruido de fondo y más específicos, lo que permitía una asignación del tamaño del fragmento analizado de manera inequívoca (Figuras 4.7 y 4.8). Esta especificidad se corroboró al no observarse ninguna amplificación con el control negativo ni con ninguna de las cepas genéticamente relacionadas con *Candida parapsilosis sensu stricto* (Figura 4.6).

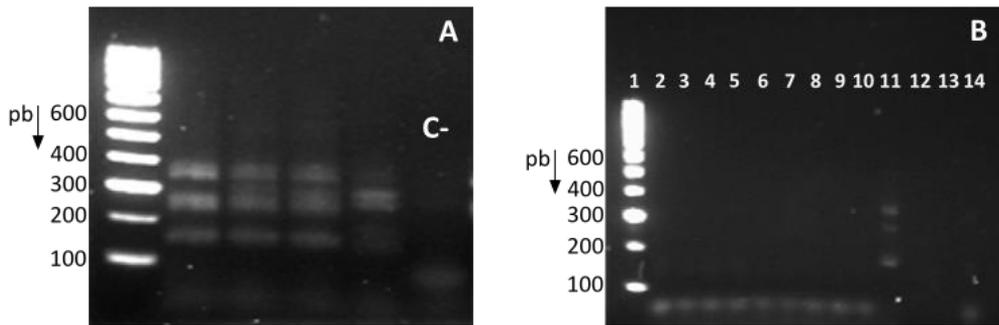


Figura 4.6. PCR múltiple realizada con la enzima AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (A), en 11 cepas genéticamente relacionadas con *Candida parapsilosis sensu stricto* (B), calles: 1. Marcador de peso molecular, 2. *Candida guilliermondii*, 3. *Candida glabrata*, 4. *Candida bracariensis*, 5. *Candida africana*, 6. *Candida albicans*, 7. *Candida krusei*, 8. *Candida nivariensis*, 9. *Candida dubliniensis*, 10. *Candida parapsilosis*, 11. *Candida metapsilosis*, 12. *Candida orthopsilosis*, 13. *Candida tropicalis* y 14. Control negativo.

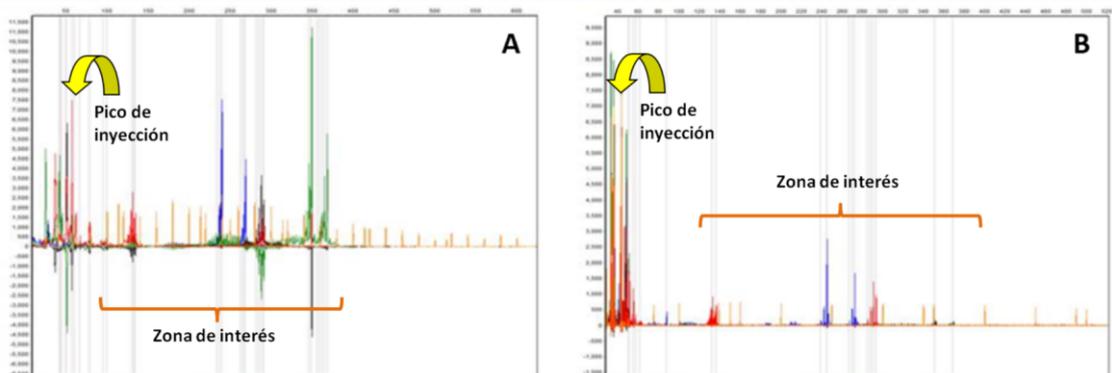


Figura 4.7. Electroferogramas obtenidos con la enzima KAPA 2G Fast Multiplex PCR kit (A) en comparación con AmpliTaq® Gold DNA (B).

Durante la valoración de los electroferogramas obtenidos en el análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar, se observaron con relativa frecuencia unas bandas inespecíficas de baja intensidad, que fueron consideradas picos sombra como resultado del «deslizamiento» de la polimerasa durante la etapa de extensión de la hebra de ADN. Sin embargo, como se puede apreciar en la figura 4.8, estos picos de baja amplitud no representaban realmente alelos, sino que eran ecos de los picos reales por lo que no interfirieron negativamente en la asignación del tamaño del fragmento analizado ni en la identificación alélica final.

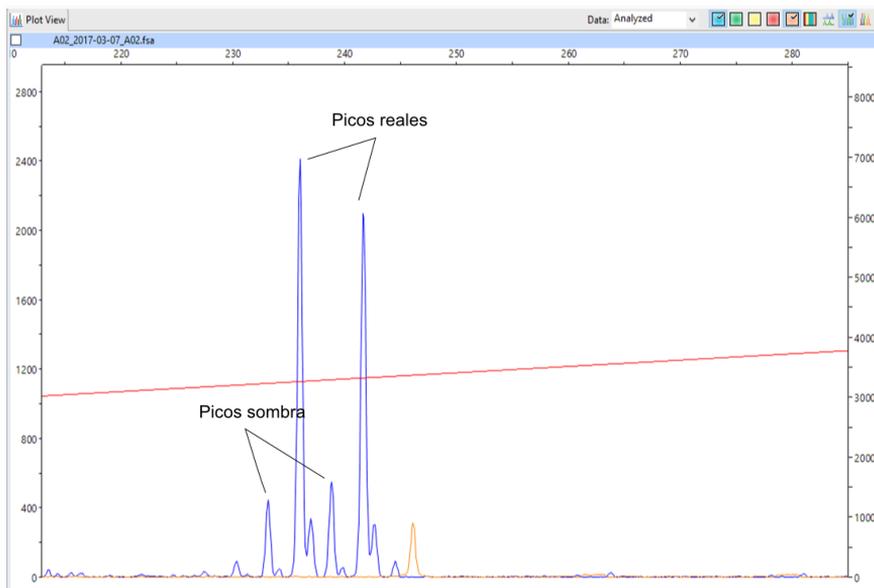


Figura 4.8. Detalle de la presencia de picos sombra.

La Tabla 4.1 resume los resultados obtenidos con las tres *mastermixes* evaluadas en este trabajo, en términos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos (VPP). Como se muestra en la tabla, la única ADN polimerasa con la que se obtuvieron valores tanto de sensibilidad como de especificidad del 100% fue la AmpliTaq Gold, corroborando lo que se había observado en los geles y concluyendo que esta enzima era la más específica y

adecuada para llevar a cabo la PCR múltiple de genotipificación por STR de *Candida parapsilosis sensu stricto*.

Tabla 4.1. Evaluación del efecto polimerasa en el protocolo de PCR múltiple.

<i>Mastermixes</i> empleadas	TaKaRa® Ex Taq	KAPA 2G Fast	AmpliTaq®
Parámetros estudiados	Hot Start Version	Multiplex PCR kit	Gold DNA
Resultados falsos positivos (FP)	13	13	0
Resultados falsos negativos (FN)	0	0	0
Resultados verdaderos positivos (VP)	2	2	2
Resultados verdaderos negativos (VN)	0	0	13
Sensibilidad (IC 95%)	100 % (15,8%-100%)	100 % (15,8%-100%)	100 % (15,8%-100%)
Especificidad (IC 95%)	0% (0%-24%)	0% (0%-24%)	100 % (75,3%-100%)
Razón de probabilidad diagnóstica positiva (RPD+) (IC95%)	0,86 (0,52, 1,45)	0,86 (0,52, 1,45)	23,33 (1,46, 371,81)
Razón de probabilidad diagnóstica negativa (RPD-) (IC95%)	4,67 (0,11, 191,86)	4,67 (0,11, 191,86)	0,17 (0,01, 2,17)
Valor predictivo positivo (VPP) (IC 95%)	13,3% (1,7%-40,5%)	13,3% (1,7%-40,5%)	100 % (15,8%-100%)

Para la elección final de la enzima se valoraron además de estos resultados, los obtenidos tras la aplicación del protocolo de amplificación *touchdown* desarrollado, con el fin de aumentar la especificidad de los productos de PCR.

c. Resultados tras la aplicación del protocolo de amplificación *touchdown*

Tomando en cuenta los resultados de validación anteriores (similitud de resultados entre las enzimas de Takara® y KAPA®), se ensayaron los cuatro protocolos con la enzima TaKaRa® Ex Taq Hot Start Version. Los resultados se compararon mediante el análisis visual de patrón electroforético obtenido en los geles de agarosa, observándose en resumen los siguientes hallazgos (Figura 4.9):

1. Diferente intensidad de bandas para los cuatro *locus* empleando los protocolos de *touchdown* 1 y 2.
2. Intensidad similar de los productos de amplificación al emplear el protocolo 3.
3. Aparición de bandas nítidas en la muestra del control negativo al aplicar los protocolos *touchdown* 1 y 3, por lo que se decidió su descarte definitivo.

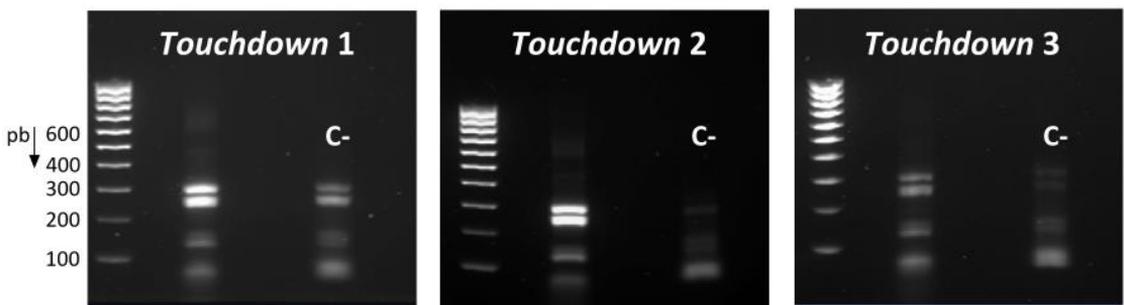


Figura 4.9. Protocolos *touchdown* 1, 2 y 3 con la enzima TaKaRa® Ex Taq Hot Start Version (C-, Control negativo).

Una vez descartados los protocolos 1 y 3 por aparición de bandas inespecíficas en el control negativo, más nítidas que con el resto de protocolos *touchdown*, se ensayaron los protocolos 2 y 4 utilizando el kit KAPA 2G Fast Multiplex PCR kit como *mastermix* para la realización de la PCR. Los resultados obtenidos para KAPA con ambos protocolos fueron más satisfactorios en cuanto a la intensidad del patrón de bandas obtenido que con la enzima de Takara, pero se obtuvieron bandas de amplificación para la muestra del control negativo en ambos programas de PCR (Figura 4.10). Por lo tanto, los resultados fueron superponibles a los descritos para el protocolo convencional, descartándose el uso de ambas enzimas para la realización del análisis de fragmentos de las regiones microsatélites objetivos designados en el presente trabajo (Figura 4.11).

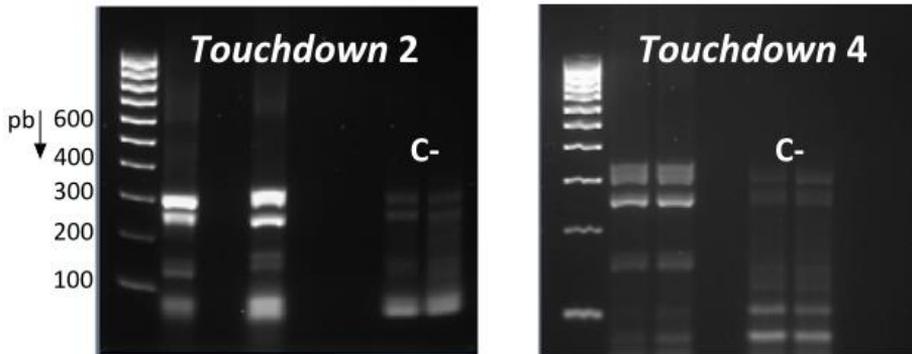


Figura 4.10. Protocolos *touchdown 2* y *4* con la enzima KAPA 2G Fast Multiplex PCR kit (C-, Control negativo).

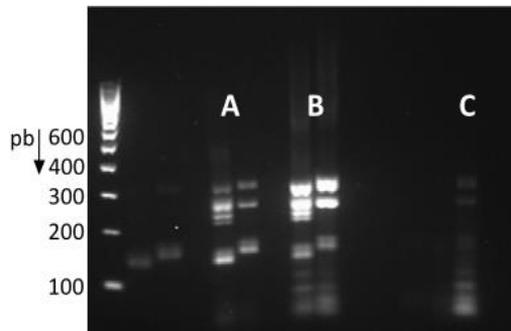


Figura 4.11. Protocolo *touchdown 4*, con la enzima TaKaRa® Ex Taq Hot Start Version (A) y con la enzima KAPA 2G Fast Multiplex PCR kit (B). Control negativo con la enzima KAPA 2G Fast Multiplex PCR kit (C)

A pesar de los datos negativos, el protocolo *touchdown 4* fue con el que se obtenían mejores resultados por lo que se eligió este esquema de amplificación con la enzima AmpliTaq® Gold DNA Polymerase. En el gel de agarosa, todos los productos de PCR mostraban una intensidad similar mientras que en el pocillo destinado al control negativo no se visualizaba ningún producto de amplificación (Figura 4.12).

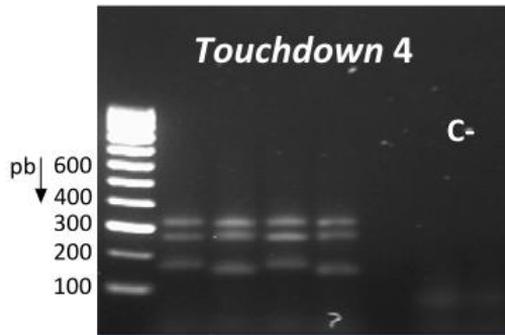


Figura 4.12. Protocolo *touchdown* 4, con la enzima AmpliTaq® Gold DNA Polymerase.

En la Tablas 4.2 y 4.3, se resumen las fases del protocolo definitivo de *touchdown* y la reacción de PCR múltiple con la enzima AmpliTaq Gold.

Tabla 4.2. Mezcla de la PCR múltiple.

Reactivos	Volumen (μl)
Tampón <i>Gold</i> 10X	2,5
MgCl ₂ (25mM)	1,5
dNTPs (10 mM)	2
Cebadores <i>Forward</i> (25μM)	0,4 X 4
Cebadores <i>Reverse</i> (25μM)	0,4 X 4
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5U/μl)	0,25
ADN extraído (10 ng/μl)	2
BSA 100X	0,25
Agua de grado PCR	14,8

Tabla 4.3. Protocolo de amplificación *touchdown* seleccionado.

Protocolo <i>touchdown</i>		
Desnaturalización inicial	95 °C, 10 min	
Fase 1: PCR (14 ciclos)	Desnaturalización	95 °C, 30 s.
	Hibridación	60 °C, 20 s. ↓0,36 °C/ciclo
	Extensión	72 °C, 30 s.
Fase 2: PCR (19 ciclos)	Desnaturalización	95 °C, 30 s.
	Hibridación	55 °C, 20 s.
	Extensión	72 °C, 30 s.
Extensión final	72 °C, 5 min.	
Enfriamiento	4 °C, ∞	

En las Figuras 4.13 y 4.14 se representan los electroferogramas obtenidos con cada uno de los *locus* estudiados mediante la reacción de PCR múltiple, para las cepas de referencia *Candida parapsilosis* ATCC22019 y *Candida parapsilosis* MYA-4646-CDC317 (empleados como referencia para la asignación alélica de los aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto* estudiados).

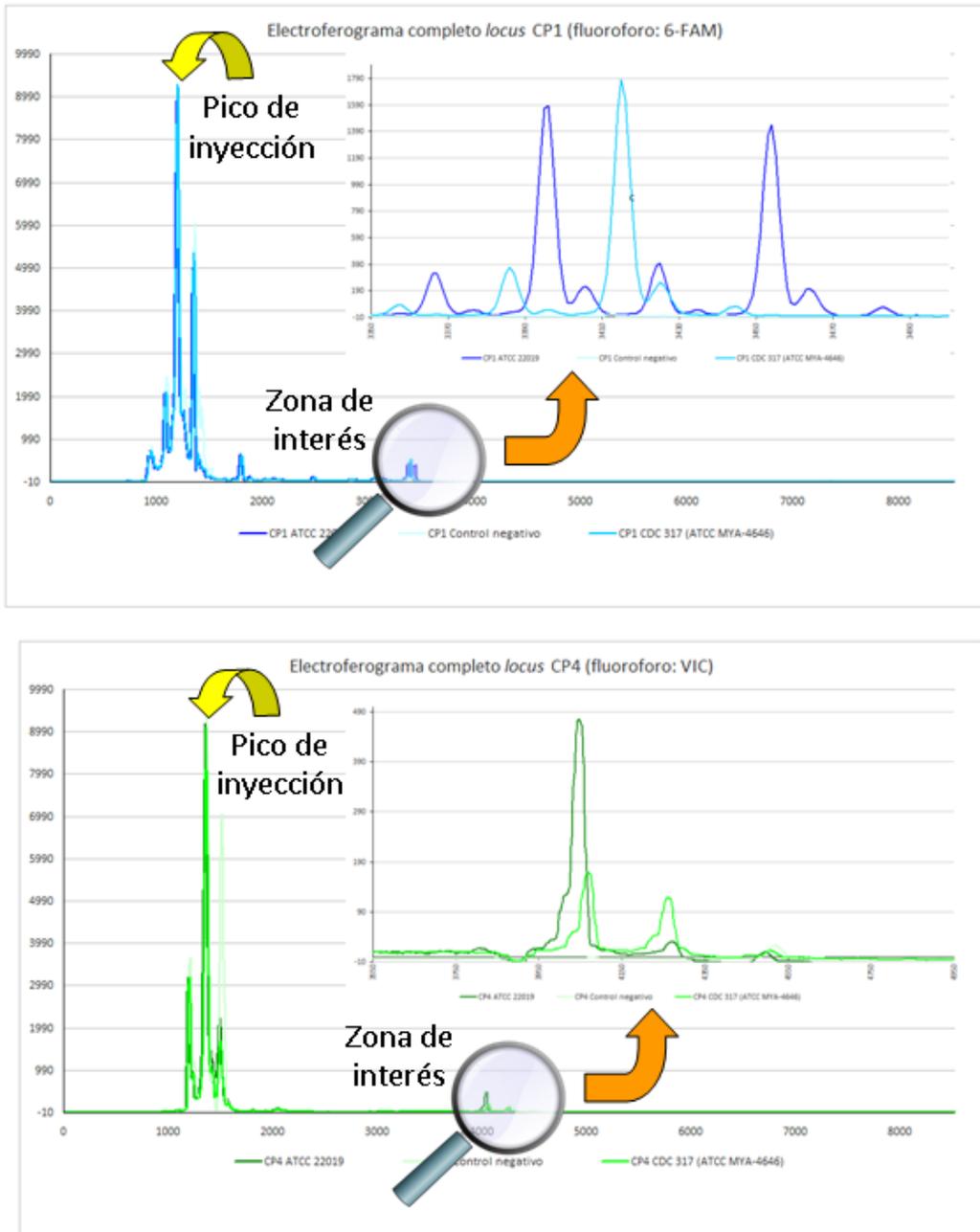


Figura 4.13. Electroferogramas correspondientes a los *locus* CP1 y CP4.

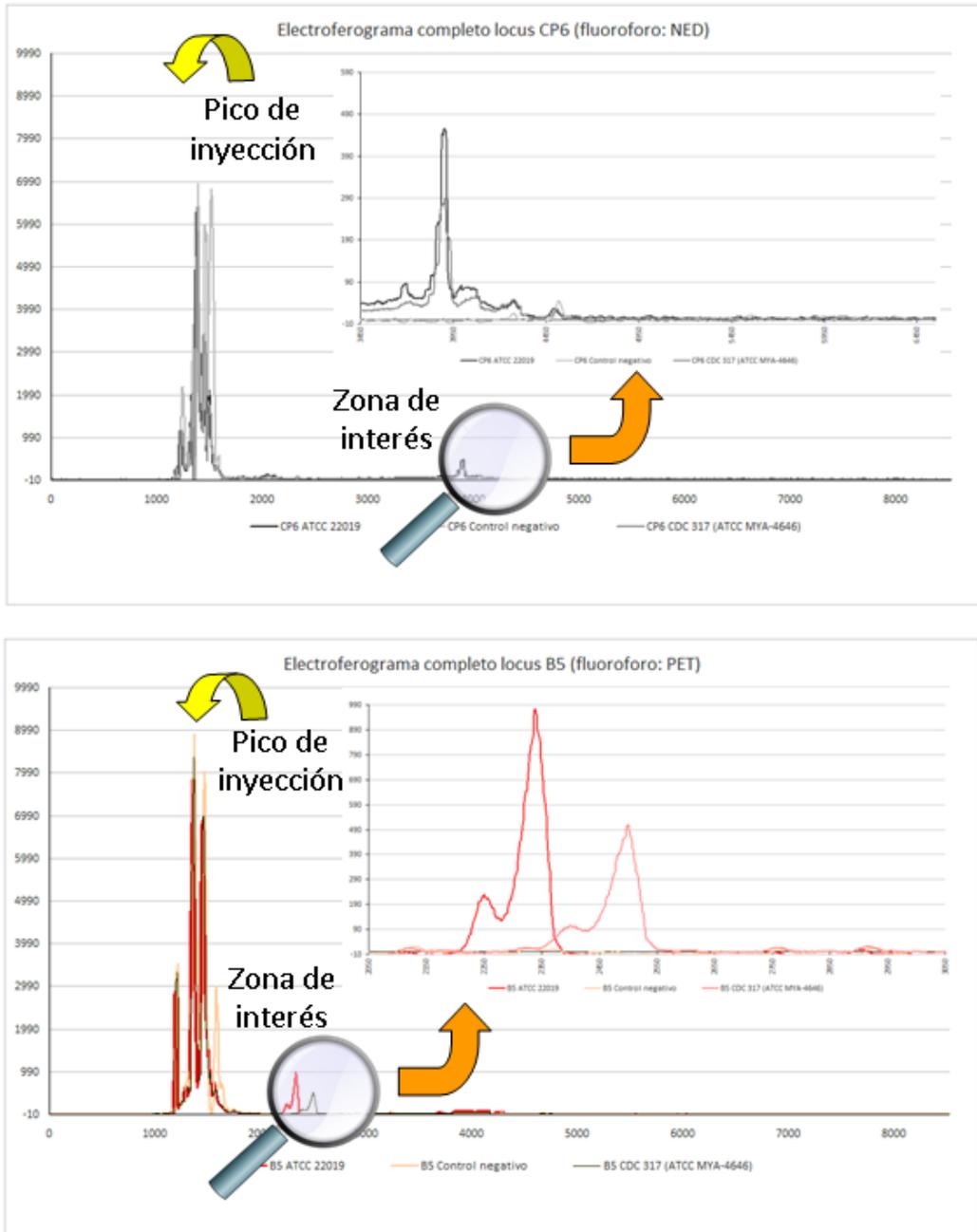


Figura 4.14. Electroferogramas correspondientes a los *locus* CP6 y B5.

d. Valoración de la eficacia del nuevo protocolo

Con el objetivo de valorar la eficacia y la concordancia del nuevo protocolo con respecto a la técnica original publicada por Sabino y colaboradores en 2010, se estimó la sensibilidad, especificidad, razón de probabilidad tanto positiva como negativa, el índice de concordancia e índice kappa. Dicha estimación se llevó a cabo en condiciones ideales empleando una muestra de cepas de referencia. Para ambas valoraciones se realizaron tablas 2 x 2 en las cuales se relacionan los resultados obtenidos con ambos métodos (Tablas 4.4 y 4.5).

Tabla 4.4. Estimación de la sensibilidad, especificidad, razones de probabilidad positiva y negativa de la prueba.

Técnica de genotipificación mediante PCR múltiple	Técnica de genotipificación original (Sabino y col., 2010)		
	Positivo (+)	Negativo (-)	Total
Positivo (+)	2	0	2
Negativo (-)	0	13	13
Total	2	13	15

Protocolo	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	Razón de probabilidad diagnóstica (RPD)	
			RPD+ (IC 95%)	RPD- (IC 95%)
PCR múltiple	100 % (15,8%-100%)	100 % (75,3%-100%)	23,33 (1,46, 371,81)	0,17 (0,01, 2,17)

Tabla 4.5. Concordancia directa e índice Kappa entre ambos protocolos.

Técnica de genotipificación mediante PCR múltiple	Técnica de genotipificación original (Sabino y col., 2010)		
	Positivo (+)	Negativo (-)	Total
Positivo (+)	2	0	2
Negativo (-)	0	13	13
Total	2	13	15

Índice de Concordancia	Concordancia esperada	Índice Kappa	Índice Kappa (Error estándar)	Z	Valor p
100%	76,89%	1	0,258	3,87	0,0001

Los resultados tras la genotipificación de las cepas de referencia fueron los mismos empleando ambas técnicas, por lo que al relacionar los resultados obtenidos con el protocolo de PCR múltiple y los obtenidos con la técnica de referencia de Sabino y colaboradores (2010), se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad del 100% (IC 95% entre 0,158 – 1 y 0,753 -1 respectivamente) para el protocolo de PCR múltiple desarrollado en este trabajo (Tabla 4.3). Estos resultados indican que, bajo condiciones ideales, la probabilidad de que se obtengan resultados fiables en cuanto a la genotipificación por STR empleando el nuevo protocolo de PCR múltiple es del 100%. El cálculo de la concordancia entre ambos métodos (empleando muestras de referencia) reflejó un valor del índice Kappa de 1 IC 95% (0,717-1,), un grado de concordancia muy bueno entre el método desarrollado en el presente trabajo de Tesis Doctoral y el original propuesto por Sabino y colaboradores (2010).

4.2. Estudios observacionales realizados para verificar la efectividad y utilidad de la técnica propuesta (Objetivo 5).

a y b Procesamiento e identificación de las muestras

Todos los pacientes seleccionados para el estudio sufrían una candidemia relacionada con la presencia de un catéter. El diagnóstico se realizó acuerdo tanto a los criterios de los CDC, como a los criterios microbiológicos establecidos para los distintos métodos de cultivo empleados: hemocultivo y cultivos semicuantitativo y cuantitativo de la punta del catéter.

De los 38 pacientes hospitalizados con candidemia, 21 (55,26%) fueron hombres y 17 (44,74%) mujeres y presentaban edades comprendidas entre los 13 días y los 90 años, con una media de 47 años (mediana de 48 años) y con una distribución de edades similar entre ambos sexos (Figura 4.15). Destacaba que cinco de los pacientes (13,16%) fueron niños con edades comprendidas entre los 13 días y cuatro años, aunque solo uno de ellos era neonato.

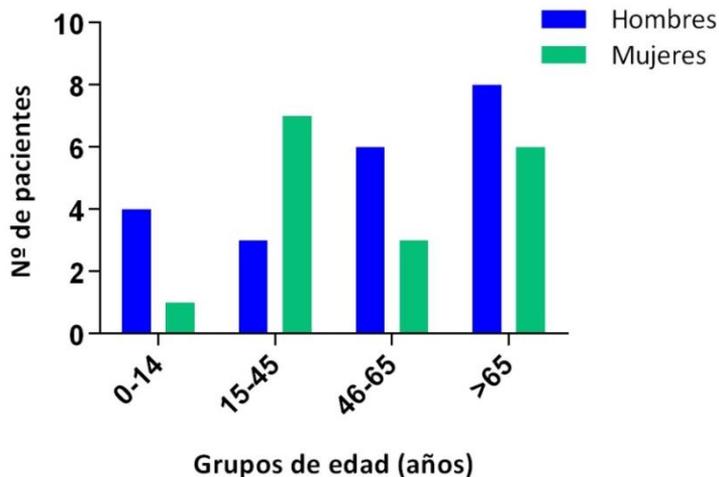


Figura 4.15. Distribución de los pacientes según los grupos de edad.

Veintiocho pacientes (73,68%) estaban ingresados en cinco unidades hospitalarias: la Unidad de Reanimación (REA) (10 pacientes y 17 aislamientos), la UCI (8 pacientes y 15 aislamientos), Unidad de Quemados (5 pacientes y 14 aislamientos), Unidad de Trasplante Pulmonar (3 pacientes y 6 aislamientos) y la Unidad de Enfermedades Infecciosas (2 pacientes y 4 aislamientos) (Figura 4.16).

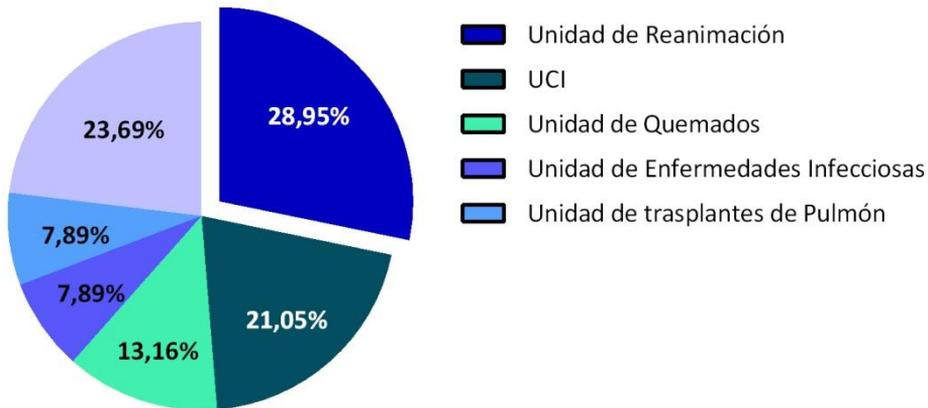


Figura 4.16. Distribución del número de casos de candidemia asociada a catéter debida a especies del complejo *Candida parapsilosis* según la unidad de ingreso.

En total se obtuvieron 82 aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu lato*, de los cuales 66 (80,48%) correspondieron a *Candida parapsilosis sensu stricto* y 16 (19,51%) a *Candida orthopsilosis*. Ningún aislamiento fue identificado como *Candida metapsilosis*. De estos 82 aislamientos identificados por PCR-RFLP, 14 (siete *Candida parapsilosis sensu stricto* y siete *Candida orthopsilosis*) procedían de una misma muestra de seis pacientes con infecciones mixtas (Figura 4.17).

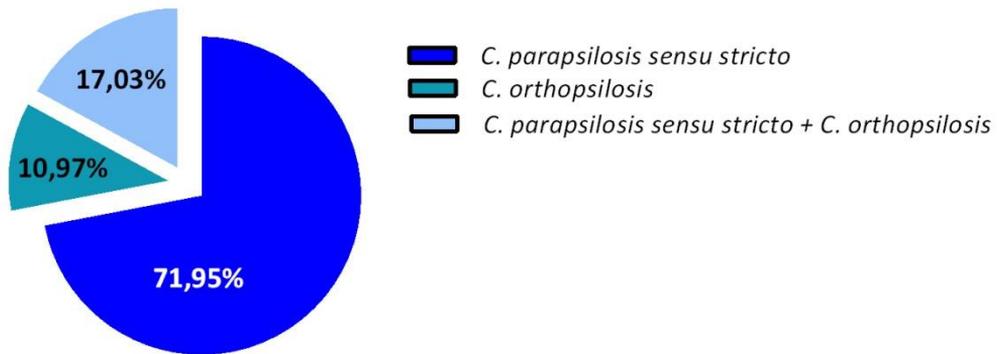


Figura 4.17. Distribución de los aislamientos del complejo *Candida parapsilosis* estudiados.

En base a los resultados obtenidos tras la identificación molecular, se confirmó que 28 pacientes (73,68%) presentaron candidemia por *Candida parapsilosis sensu stricto*, tres (7,89%) por *Candida orthopsilosis* y seis (15,79%) sufrían una infección mixta por *Candida parapsilosis sensu stricto* y *Candida orthopsilosis*. De uno de los pacientes (paciente 20) se aisló *Candida tropicalis* en el hemocultivo, mientras que de la punta del catéter se aisló *Candida parapsilosis sensu stricto*.

c. Genotipificación de aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto* con el nuevo protocolo de PCR múltiple basado en STR

Todos los aislamientos clínicos identificados molecularmente como *Candida parapsilosis sensu stricto* fueron genotipificados mediante el protocolo desarrollado en el presente trabajo. En total se analizaron 66 aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* de 35 pacientes, 33 procedentes de hemocultivo y 33 del cultivo de la punta del catéter.

El análisis por STR confirmó que 27 (77,14%) de los pacientes presentaban una CRC ya que tanto el aislamiento del hemocultivo como el de la punta de catéter poseían genotipos idénticos o microvariaciones de estos. Sólo en dos de los pacientes se observaron microvariaciones entre aislamientos, el paciente 18 en el cual se constataron microvariaciones en el *locus* B5 al comparar el aislamiento del hemocultivo con el de la

punta del catéter (9 pb) y el paciente 31 en que se apreció una microvariación en el *locus* CP4 (4 pb) al comparar ambos aislamientos clínicos entre sí.

Dos (8%) de los pacientes infectados por aislamientos con genotipos idénticos presentaron realmente una infección policlonal al incluir más de un aislamiento de *Candida parapsilosis sensu stricto* en una misma muestra. El paciente 3 presentaba dos aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* con genotipos diferentes en el hemocultivo, uno de ellos idéntico al de la punta del catéter. Por el contrario, el paciente 24 además del aislamiento de *Candida parapsilosis sensu stricto* aislado en el hemocultivo presentaba otro de genotipo diferente al del cultivo del catéter. Estos resultados sólo pudieron ser confirmados mediante el empleo de la técnica de STR.

Los 8 (22,86%) pacientes restantes no mostraron una CRC, ya que los aislamientos tanto del hemocultivo como de la punta del catéter eran genotípicamente diferentes. Solo uno de los pacientes (paciente 32) presentó diferencias entre aislamientos en un único *locus*; sin embargo, como la diferencia fue mayor de 9 pb (43 pb) se consideraron genotipos diferentes a pesar de su potencial relación filogenética (Tabla 8.1 en material suplementario).

- **Genotipos y relaciones filogenéticas**

El análisis por STR permitió agrupar los 68 aislamientos en 27 genotipos diferentes. Diecinueve (70,37%) genotipos solo se observaron una vez (en un único paciente) mientras que siete (25,93%) estaban presentes en al menos dos pacientes. Estos genotipos fueron nombrados como G1 a G7 (Tabla 4.6). De entre estos siete genotipos, dos fueron los más prevalentes, G3 y G7 ya que estaban representados por siete aislamientos cada uno, que fueron aislados de cinco y cuatro pacientes respectivamente. En la Tabla 4.6 se muestran las características más relevantes de estos genotipos.

Tabla 4.6. Genotipos prevalentes en *Candida parapsilosis sensu stricto*.

Genotipo	Aislamientos (pacientes)	Fragmentos STR (pb)	Año	Unidad hospitalaria
G1	5 (3)	236/242 307/307 264/281 132/139	2010 2012 2013	CIP U. TX. Pulmón Nefrología
G2	4 (2)	236/242 307/307 264/264 139/139	2012 2015	UCI Hematología
G3	7 (5)	222/242 369/369 320/320 134/134	2013 2014 2015	REA Cardiología Quemados
G4	5 (3)	222/242 372/372 305/308 134/134	2012 2013 2014	UCI, Gastroenterología REA Cardiología Cirugía
G5	5 (4)	222/242 369/369 270/320 134/134	2013 2015	U. TX pulmón Cirugía digestiva
G6	3 (2)	216/222 372/372 305/308 134/134	2013	Oncología REA
G7	7 (4)	242/242 360/363 267/270 120/135	2012 2015 2016	Quemados UCI Enf. infecciosas

CIP: Cuidados Intensivos Pediátricos; U. TX. Pulmón: Unidad de Trasplante Pulmonar; REA: Unidad de Reanimación; Enf. Infecciosas: Unidad de Enfermedades Infecciosas.

En la Figura 4.18 se muestra mediante un dendrograma desarrollado a partir del perfil alélico (pb) obtenido por STR de cada una de los aislamientos clínicos, las relaciones filogenéticas entre los genotipos prevalentes (Figura 4.18).

Los resultados gráficos sugieren la existencia de dos clados o *clusters* claramente diferenciados, que separan genotipos que se pueden considerar estrechamente relacionados desde el punto de vista filogenético. A esos dos *clusters* se le denominó de manera arbitraria A y B.

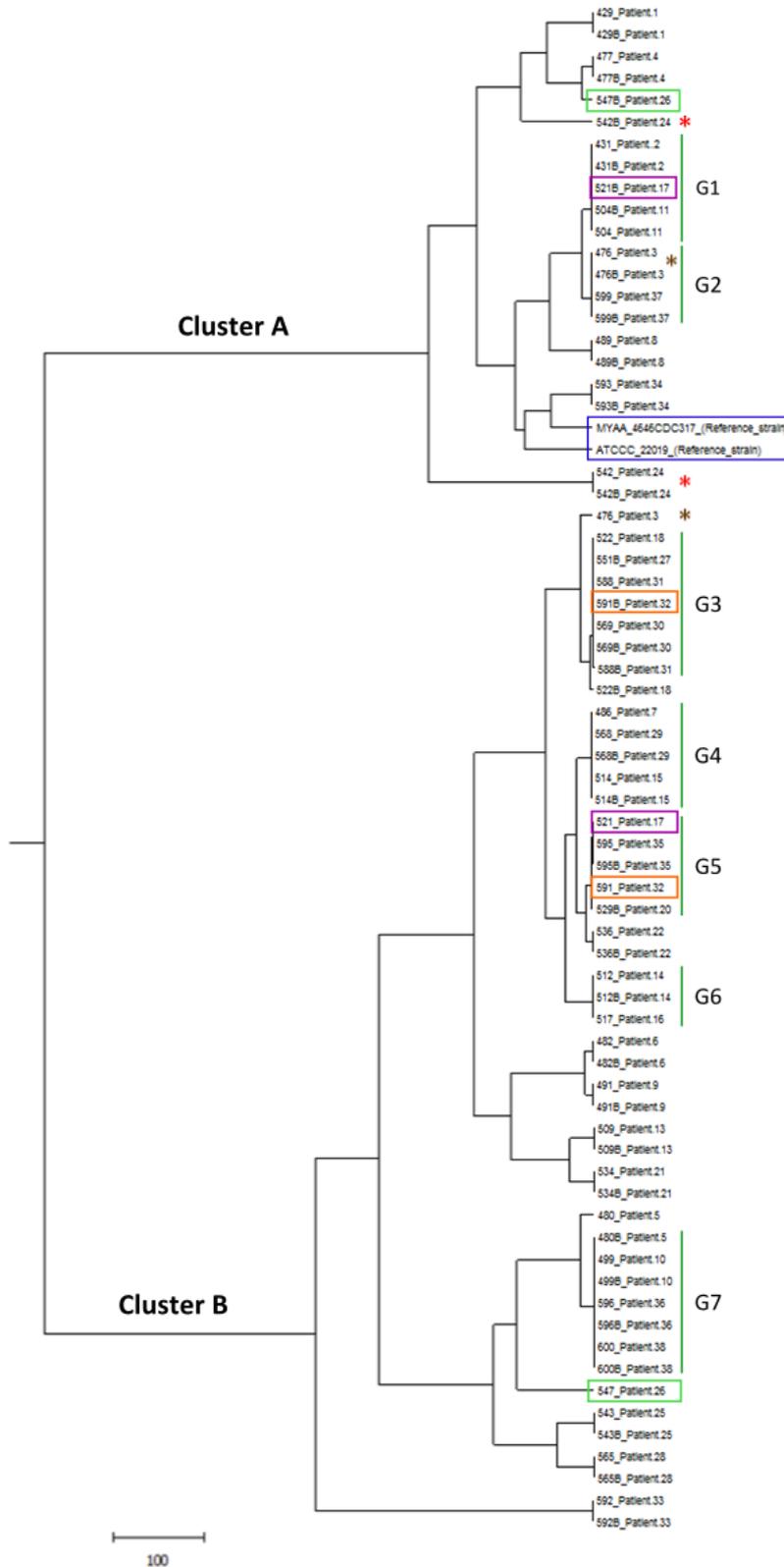


Figura 4.18. Relaciones filogenéticas entre los aislamientos de sangre y catéter.

El clado o *cluster A*, estaba conformado por aislamientos de 11 (28,95%) pacientes y 9 (33,33%) genotipos diferentes entre los que se encontraban los genotipos más prevalentes (G1 y G2), mientras que el grupo o *cluster B*, estaba conformado por aislamientos de 27 (71,05%) pacientes y 18 (66,67%) genotipos diferentes entre los cuales se encontraban el resto de genotipos prevalentes (G3-G7).

Un análisis más detallado del dendrograma, en función de las distancias genéticas entre aislamientos, mostró que dentro del grupo o *cluster A* existían dos subclados (A_1 , A_2) claramente diferenciados. Al analizar los datos relativos a aislamientos incluidos en el subgrupo A_2 , se constató que uno de ellos (CP542) era resistente a fluconazol (CMI de 8 $\mu\text{g/ml}$) mientras que el aislamiento CP542B no mostró resistencia, pero si CMI más elevadas que los aislamientos incluidos en el subclado A_1 , que fueron todos sensibles a los azoles (Figura 4.19).

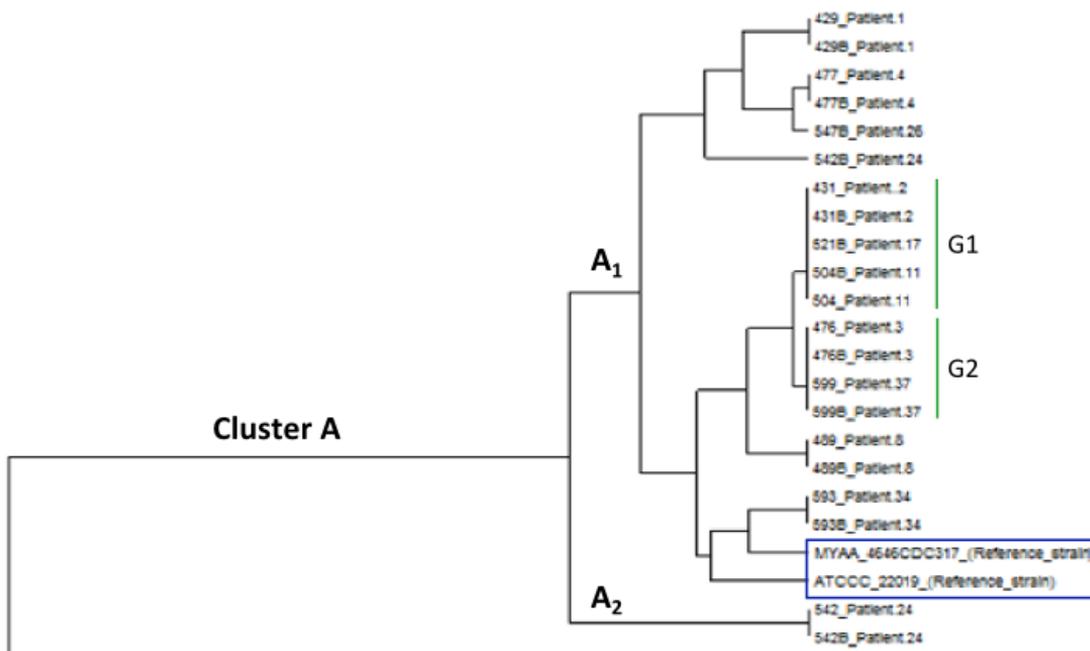


Figura 4.19. Relaciones filogenéticas entre los aislamientos clínicos que conformaban el clado o *cluster A*.

El *cluster* B estaba conformado principalmente por tres subgrupos (B_1 , B_2 y B_3), a su vez cada uno de los subgrupos estaba integrado por diferentes subgrupos menores más homogéneos. Dos aislamientos (CP592 y CP592B) estaban claramente diferenciados del resto y conformaban el subgrupo B_3 . En este caso no se observaron asociaciones destacables entre las relaciones filogenéticas y los patrones de sensibilidad a los diferentes fármacos antifúngicos ensayados (Figura 4.20).

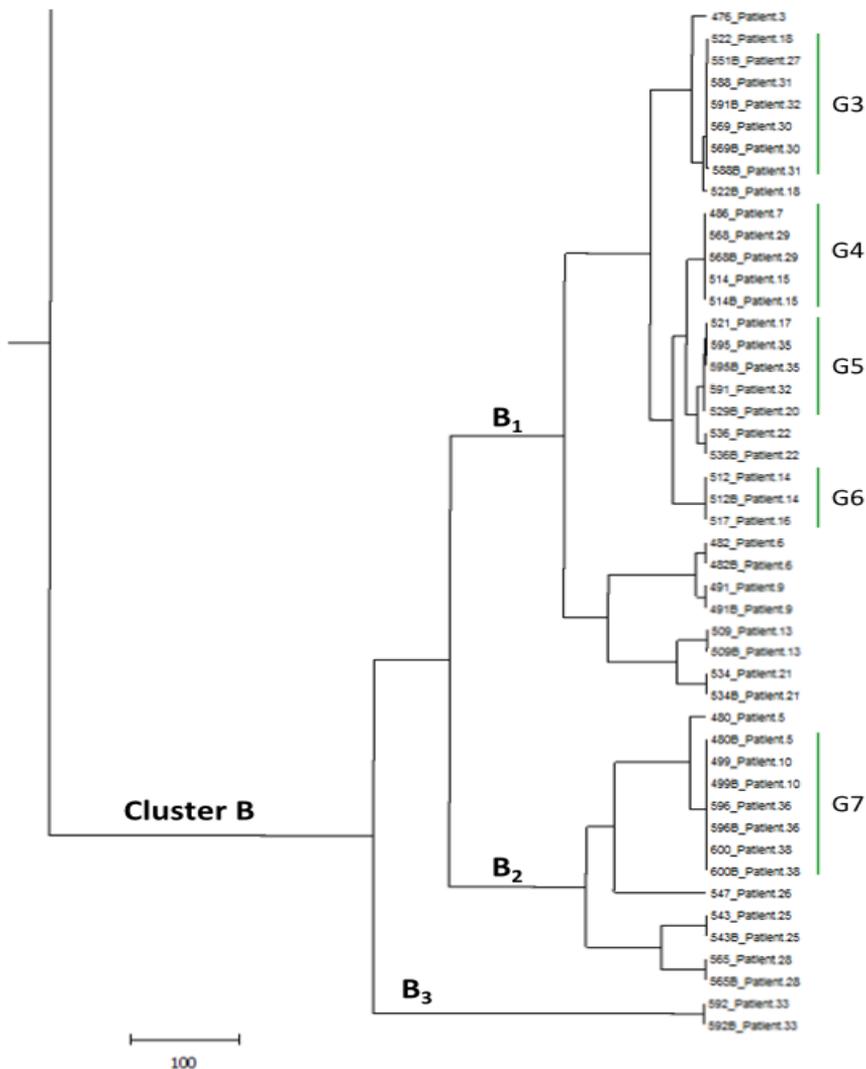


Figura 4.20. Relaciones filogenéticas entre los aislamientos clínicos que conformaban el clado o *cluster* B.

El dendrograma también permitió establecer las relaciones filogenéticas, en base a la mayor o menor distancia genética, entre los distintos aislamientos de cada pareja de muestras (sangre-catéter) de un mismo paciente. Tres parejas de aislamientos mostraban distancias filogenéticas significativamente grandes entre los aislamientos. En concreto, el aislamiento CP547B perteneciente al paciente 26 estaba englobado en el *cluster* A (Subclado A₁) mientras que el procedente del hemocultivo de ese mismo paciente (CP547) formaba parte del *cluster* B concretamente en el subclado B₂. Una situación similar se constató en el paciente 17 cuyo aislamiento de la punta del catéter (CP521B) formaba parte del *cluster* A (A₂) y presentaba el genotipo G1. Sin embargo, el aislamiento de hemocultivo (CP521) formaba parte del *cluster* B (B₁) y presentaba un perfil genotípico G5. Por último, de los aislamientos del paciente 32 (CP591 y CP591B), aunque se encontraban en el mismo *cluster* (B), el aislamiento 591B presentaba el genotipo G3 mientras que el CP591 mostraba el genotipo G5, por lo que a diferencia de los casos anteriores aun estando ambos aislamientos filogenéticamente separados ambos se encontraban en un mismo *cluster*.

La genotipificación mediante STR permitió elucidar dos casos de infecciones policlonales (pacientes 3 y 24). En el dendrograma (Figura 4.16) se puede observar la relación entre los genotipos adicionales observados en dos aislamientos (CP476 y CP542B). El genotipo adicional observado en el aislamiento de sangre CP476 obtenido del paciente 3 pertenecía al *cluster* B (B₁) mientras que el otro aislamiento de sangre y el catéter mostraban genotipos idénticos (G3) y estaban incluidos en el *cluster* A (A₁). Por otro lado, el genotipo adicional detectado en el aislamiento de punta de catéter (CP542B) del paciente 24 pertenecía al *cluster* A (A₁) al igual que los aislamientos del catéter y de la sangre; sin embargo, estos últimos estaban subagrupados en A₂, siendo estos los únicos aislamientos de dicho subgrupo.

- **Relación entre genotipo, año y unidad hospitalaria de aislamiento**

El análisis temporal de la secuencia de aparición de los distintos genotipos reveló que durante el primer año (2010) se identificaron únicamente dos genotipos diferentes, entre los que se encontraba el genotipo G1, que fue el primero en aparecer de los genotipos considerados prevalentes. Este genotipo permaneció en la UCI pediátrica (CIP) y la unidad

de reanimación (REA) del hospital durante los años 2012 y 2013. Sin embargo, durante el año 2012, se apreció un crecimiento del número de clones, identificándose ocho genotipos diferentes, entre ellos G2, G4 y G7 que fueron aislados por primera vez ese año. De estos ocho genotipos, seis procedían de pacientes ingresados en la UCI, hecho que sugiere que las CRC en dicha unidad tuvieron una fuente de infección primaria distinta. El año 2013 fue el año en el que se registró un mayor número de genotipos, diez, los genotipos G3, G5 y G6 se identificaron por primera vez. En este año, la REA fue la unidad hospitalaria en la que más casos de candidemia por *Candida parapsilosis sensu stricto* con genotipo G3 se registraron. En los años 2014 y 2015, fueron siete los genotipos identificados siendo, en el año 2014, la Unidad de Trasplante de Pulmón la que mayor número de CRC registró. En el año 2016 solo se procesaron las muestras de un solo paciente con genotipo G7 y del año 2011 no se obtuvieron muestras (Figura 4.21).

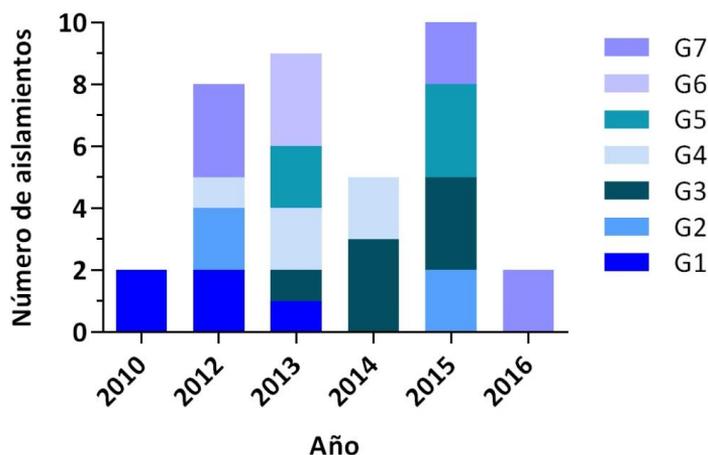


Figura 4.21. Relación entre los genotipos prevalentes y el año de aparición.

La genotipificación por STR, también permitió establecer relaciones entre los diferentes pacientes y las cepas de *Candida parapsilosis sensu stricto* aisladas. En el año 2012, del paciente 5 ingresado en la Unidad de Quemados y del paciente 10, ingresado en la UCI, se aislaron cepas de *Candida parapsilosis sensu stricto* con un perfil genotípico idéntico (G7). El mismo hecho se constató en el año 2013 con el paciente 14 ingresado en la Unidad de

Oncología y el paciente 16 (aislamiento CP517) ingresado en la REA. En este último paciente, los aislamientos mostraron el genotipo G6. En el año 2014, nuevamente los aislamientos de los pacientes 27 y 30 ingresados en la REA y la Unidad de Quemados, respectivamente, presentaron un genotipo idéntico, el genotipo G3. Por último, en el año 2015, en los pacientes 31 y 32 ingresados en el momento del diagnóstico de la candidemia en la REA y la Unidad de Cardiología, respectivamente, se cultivaron aislamientos con un idéntico perfil genotípico G3.

Cabe destacar que en la REA se identificaron aislamientos con idéntico genotipo de los pacientes 18, 27 y 31 que habían ingresado en años consecutivos, 2013, 2014 y 2015. Lo mismo se observó en los pacientes 36 y 38 ingresados en el momento del diagnóstico en la Unidad de Enfermedades Infecciosas durante 2015 y 2016, respectivamente (Tabla 8.2 en material suplementario).

- **Infección mixta por *Candida parapsilosis sensu stricto* y *Candida orthopsilosis***

Como se ha mencionado con anterioridad, seis de los pacientes (pacientes 7, 16, 17, 18, 26 y 27) incluidos en este estudio presentaron una infección mixta por *Candida parapsilosis sensu stricto* y *Candida orthopsilosis*

En la Tabla 4.7 se puede observar la muestra de origen de la infección mixta, así como los resultados de genotipificación de todas los aislamientos de *Candida* de los seis pacientes que sufrieron dichas infecciones.

Tabla 4.7. Pacientes en los que se observó infección mixta por *Candida parapsilosis sensu stricto* y *Candida orthopsilosis*.

Paciente	Año	Origen	Especie aislada	Fragmentos microsatélites (pb)			
				CP1	CP4	CP6	B5
7	2012	Sangre	<i>C. parapsilosis</i>	222/242	372/372	305/308	134/134
			<i>C. orthopsilosis</i>	ND ¹	ND	ND	ND
		Catéter	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
16	2013	Sangre	<i>C. parapsilosis</i>	216/222	372/372	305/305	134/134
			<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
		Catéter	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
17	2013	Sangre	<i>C. parapsilosis</i>	222/242	369/369	270/319	134/134
			<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
		Catéter	<i>C. parapsilosis</i>	236/242	307/307	264/281	132/140
18	2013	Sangre	<i>C. parapsilosis</i>	222/242	370/370	320/320	134/134
			<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
		Catéter	<i>C. parapsilosis</i>	222/242	370/370	320/320	125/134
26	2014	Sangre	<i>C. parapsilosis</i>	239/242	379/379	250/250	134/134
			<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
		Catéter	<i>C. parapsilosis</i>	236/242	307/307	264/282	132/132
			<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
27	2014	Sangre	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
		Catéter	<i>C. parapsilosis</i>	222/242	369/369	320/320	134/134
			<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND

¹ ND: No determinado.

Como se puede apreciar en la Tabla 4.7, sólo se observaron infecciones mixtas durante tres años consecutivos, desde 2012 a 2014, siendo 2013 el año de mayor prevalencia. De los seis pacientes que sufrieron una candidemia mixta, tan sólo en el paciente 26 se logró obtener un cultivo mixto en ambas muestras procesadas (hemocultivo y punta de catéter), mientras que en cuatro (pacientes 7, 16, 17 y 18), el cultivo mixto únicamente se obtuvo en el hemocultivo y, en el paciente 27, el cultivo mixto se relacionaba con la punta del catéter. En los pacientes 7, 16 y 27, se aisló *Candida orthopsilosis* en las muestras sin cultivo mixto.

En cuanto a la genotipificación por STR de los aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* procedentes tanto de los cultivos mixtos como los que se obtuvieron de la muestra pareja correspondiente de cada uno de los pacientes, se observaron ocho genotipos diferentes, tres de ellos fueron casos de microvariaciones. Los aislamientos de

Candida parapsilosis sensu stricto de los pacientes 7 y 16 procedentes de los cultivos mixtos, mostraron genotipos con una diferencia de 6 pb para un único alelo del *locus* CP1, mientras que el resto de *loci* estudiados fueron idénticos. De las muestras de los pacientes 18 y 27, se obtuvieron aislamientos genotípicamente idénticos, observándose microvariaciones entre estos y el aislamiento de *Candida parapsilosis sensu stricto* aislado de la punta de catéter del paciente 18, con una diferencia de 9 pb en un solo alelo del *locus* B5. También se observaron microvariaciones entre el aislamiento de *Candida parapsilosis sensu stricto* implicada en la infección mixta aislada del paciente 26 y el aislamiento de *Candida parapsilosis sensu stricto* aislada de la punta del catéter del paciente 17, siendo en este último caso la diferencia igual a 8 pb y localizada en el *locus* B5.

Es importante destacar que los pacientes 16 y 18 en el momento de la toma de muestras, estuvieron ingresados en la misma unidad hospitalaria, REA, durante el mismo año, 2013, y ambos padecían un aneurisma. Sin embargo, los aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* causantes de la candidemia presentaban genotipos diferentes, lo que sugiere una fuente distinta de la infección.

- **Producción de biopelículas**

La producción de biopelículas por los aislamientos del complejo *Candida parapsilosis* tanto del hemocultivo como de la punta de catéter se determinó en ARC. Los resultados fueron expresados en función del fenotipo (Figura 4.22).

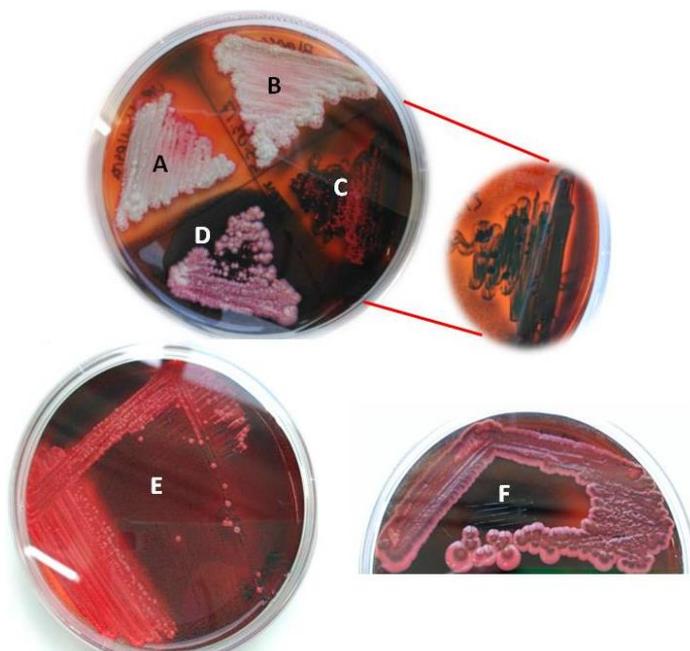


Figura 4.22. Crecimiento en Agar rojo Congo. Colonias blancas-fenotipo negativo (A y B), colonias negras-fenotipo positivo (C), colonias rosas (D) y rosas con centro negro-fenotipo positivo (F), colonias rojas oscuras y rojas-fenotipo positivo (E).

De los 75 aislamientos del complejo *Candida parapsilosis*, un total de 54 (72%) desarrollaron biopelículas. De estos 54, 46 aislamientos (61,33%) fueron clasificados como productores fuertes (colonias negras o rojas) y ocho (10,67%) como productores débiles (colonias rosas) (Tabla 4.8). A pesar de que todos los aislamientos de *Candida orthopsilosis* fueron formadores de biopelícula, y de que nueve aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* (15,25%) no desarrollaron biopelícula, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,208$).

Tabla 4.8. Formación de biopelículas en ARC del complejo *Candida parapsilosis*.

Especie	n	Producción de biopelículas n (%)			
		Fuerte (+)	Débil (+)	Negativa	Mixta ¹
<i>Candida parapsilosis sensu stricto</i>	59	34 (57,63%)	6 (10,17%)	9 (15,25%)	10 (16,95%)
<i>Candida orthopsilosis</i>	9	8 (88,89%)	1 (11,11%)	-	-
Cultivo mixto	7	4 (57,14%)	1 (14,29%)		2 (28,57%)
Total	75	46 (61,33%)	8 (10,67%)	9 (12%)	12 (16%)

¹ Para un mismo aislamiento, indica presencia de ambos fenotipos (positivo y negativo).

En cuanto a la relación entre el tipo de muestras clínicas y la capacidad de formación de biopelículas, se observó que, de los aislamientos procedentes de hemocultivo, 25 de 37 (67,57%) fueron productores de biopelícula, mientras que de los 38 aislados de catéter, 29 (76,32%) desarrollaron biopelícula. Al igual que en el caso anterior, las diferencias observadas en la capacidad de producir biopelícula en función de la muestra de origen del aislamiento no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,399$) (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Formación de biopelículas por aislamientos procedentes de hemocultivo y punta del catéter.

Formación de biopelículas	Hemocultivo	Catéter	Total
Fenotipo + (fuerte)	21 (56,76%)	25 (65,79%)	46 (61,33%)
Fenotipo + (débil)	4 (10,81%)	4 (10,53%)	8 (10,67%)
Fenotipo -	4 (10,81%)	5 (13,16%)	9 (12%)
Fenotipo mixto	8 (21,62%)	4 (10,53%)	12 (16%)
Total	37	38	75

En contraste a lo descrito anteriormente, si había diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) en la capacidad de producción de biopelículas entre las cepas aisladas de la punta del catéter implicadas en CRC y las no implicadas en CRC. Veintidós aislamientos (57,89%) del complejo *Candida parapsilosis* aislados de la punta del catéter de pacientes con CRC eran productores de biopelículas, mientras que tan sólo siete aislamientos (18,42%)

asociados a candidemias no relacionadas con catéter producían biopelículas. Sin embargo, en siete pacientes con CRC (pacientes 1, 9, 24, 33, 35, 37 y 38) (18,42%), los aislamientos tanto de hemocultivo como de la punta de catéter, a pesar de tener genotipos idénticos, presentaban fenotipos diferentes en el ARC. Además, el aislamiento del hemocultivo del paciente 1 fue el único que no era productor de biopelícula en contraste con el aislamiento de la punta del catéter del mismo paciente que sí producía biopelícula.

Al relacionar la capacidad de formación de biopelículas (fenotipo) y el genotipo, se observó que todos los aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* con genotipo G1 y G6 eran productores de biopelículas. Además, seis aislamientos (85,71%) con genotipo G7 mostraron capacidad para formar biopelículas. Sin embargo, únicamente un aislamiento con genotipo G5 mostró un fenotipo positivo de producción de biopelícula en este medio (Tabla 4.10). A pesar de las diferencias existentes entre genotipos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,1181$) en la distribución de cada uno de los genotipos y las distintas categorías de formación de biopelícula consideradas.

Tabla 4.10. Relación entre los genotipos y la producción de biopelícula.

Genotipo	Nº de aislamientos	Nº de aislamientos (%) con producción de biopelículas			
		Fenotipo +: colonias negras-rojas	Fenotipo +: colonias rosas	Fenotipo -: colonias blancas	Fenotipo mixto ¹
G1	5	3 (60%)	2 (40%)	-	-
G2	4	2 (50%)	1 (25%)	-	1 (25%)
G3	7	3 (42,86%)	1 (14,28%)	-	3 (42,86%)
G4	5	3 (60%)	-	2 (40%)	-
G5	5	1 (20%)	-	1 (20%)	3 (60%)
G6	3	2 (66,67%)	1 (33,33%)	-	-
G7	7	6 (85,71%)	-	-	1 (14,29%)
Otros	32	18 (56,25%)	3 (9,38%)	6 (18,75%)	5 (15,63%)
Total	66	37	8	9	12

¹ Para un mismo aislamiento, indica la presencia de fenotipos positivos y negativos.

d. Valoración de la efectividad de la nueva técnica.

Con el objeto de valorar la efectividad de la nueva técnica en la genotipificación de aislamientos y el diagnóstico de CRC, se evaluó la eficacia, así como la concordancia entre los resultados obtenidos al genotipificar 68 aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto* con el protocolo de PCR múltiple validado en este trabajo. Para ello se estimó la sensibilidad, especificidad, razón de probabilidad tanto positiva como negativa, el índice de concordancia e índice kappa. Para ambas valoraciones se realizaron tablas 2 x 2 en las cuales se relacionan los resultados obtenidos con ambos métodos (Tablas 4.11 y 4.12).

Tabla 4.11. Estimación de la sensibilidad, especificidad, razones de probabilidad y valores predictivos de la genotipificación mediante el protocolo de PCR múltiple.

Técnica de genotipificación mediante PCR múltiple	Identificación especie por PCR (criterios del CDC)		
	CRC (+)	NCRC (-)	Total
CRC (+)	27	4	31
NCRC (-)	0	7	7
Total	27	11	38

Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	RP		VP	
		RP+ (IC 95%)	RP- (IC 95%)	VPP ¹ (IC 95%)	VPN ¹ (IC 95%)
100% (87,2%-100%)	63,6% (30,8%-89,1%)	2,62 (1,26%-5,45%)	0,03 (0%-0,46%)	87,1% (70,2%-96,4%)	100% (59%-100%)

¹VP, Valores predictivos ajustados según la prevalencia de candidiasis invasiva estimada (5,75%) en el estudio EPINE de 2016 (EPINE-EPPS 216); RP: Razón de probabilidad.

Tabla 4.12. Concordancia directa e índice Kappa entre ambos protocolos.

Técnica de genotipificación mediante PCR múltiple	Identificación especie por PCR (criterios del CDC)		
	Positivo (+)	Negativo (-)	Total
Positivo (+)	27	4	31
Negativo (-)	0	7	7
Total	27	11	38

Índice de Concordancia	Concordancia esperada	Índice Kappa	Índice Kappa (Error estándar)	Z	Valor p
89,47%	63,30	0,713	0,155	4,59	0,000

e. Análisis de la información contenida en las regiones analizadas para la tipificación molecular

Para los cuatro microsatélites estudiados se encontraron un total de 73 alelos diferentes (número medio de alelos/*locus* -NMA- = 18,25). El microsatélite que presentó un mayor número de alelos diferentes fue CP4, con 24, y el que menos CP1 con nueve. Al analizar los aislamientos clínicos según su origen, los procedentes de hemocultivo presentaron 66 alelos diferentes (NMA = 16,50) y los de la punta de catéter mostraron 69 alelos diferentes (NMA, 17,25). Para los microsatélites CP4, CP6 y B5 se observaron alelos exclusivos, es decir, alelos que solo se observaron o en aislamientos de sangre o en aislamientos de catéter (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Alelos obtenidos para cada uno de los *loci* estudiados.

<i>Locus</i>	Nº de alelos	Frecuencia de repetición alélica	Frecuencia alélica ¹	Alelos exclusivos	
				Hemocultivo	Catéter
CP1	9	2-66	0,0147-0,4853	-	-
CP4	24	1-29	0,0074-0,2132	323, 362	324, 352, 361, 364, 373
CP6	22	1-19	0,0074-0,1397	276	285
B5	18	1-46	0,0074-0,3382	153	140

¹ Valores máximos y mínimos.

Una vez calculadas las frecuencias alélicas, empleando el software Microsatellite Toolkit (Park, 2001), de cada uno de los alelos identificados se determinó la eficiencia de los

marcadores genéticos seleccionados mediante el cálculo de los parámetros estadísticos, PIC, PD, índice de heterocigosidad y la entropía de acuerdo a lo establecido en el apartado 3.5 de metodología (Tabla 4.14).

Tabla 4.14. Resultados de los parámetros estadísticos que informan de la eficiencia de la técnica.

Parámetros	CP1	CP4	CP6	B5	CP1+CP4+CP6+B5 ¹
Contenido de información polimorfa (PIC)	0,656	0,882	0,922	0,829	0,967
Índice de Simpson (PD)	0,693	0,890	0,927	0,841	0,968
Heterocigosidad observada	0,838	0,309	0,618	0,368	-
Heterocigosidad esperada	0,698	0,897	0,934	0,847	-
Estimación no sesgada de la heterocigosidad	0,693	0,891	0,928	0,841	0,969
Entropía (en bits)	0,000	3,759	4,049	3,316	5,159

¹Parámetros estimados para la globalidad de los marcadores empleados.

Basándonos en los resultados obtenidos, de los marcadores STR utilizados para el estudio de esta población, el *locus* más informativo fue CP6 con un valor PIC de 0,829, seguido de CP4 y B5. Por el contrario, CP1 fue el que mostró un menor grado de información al tener un PIC de 0,656.

En cuanto a la capacidad de diferenciar genéticamente individuos (aislamientos) no relacionados y tomados al azar (PD), CP6 fue el marcador que presentó mayor capacidad con un valor de PD de 0,927. La globalidad de los marcadores empleados mostró un PD igual a 0,968, demostrando el alto poder discriminatorio de la técnica.

4.3. Estudios observacionales para verificar la efectividad y utilidad de la técnica propuesta (Objetivo 6).

a. Pacientes y aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto*

Durante el período de estudio (enero de 2009 y febrero de 2010) se incluyeron un total de 1.357 casos de fungemia. Se aislaron un total de 400 aislamientos de *Candida parapsilosis sensu lato*, mostrando una incidencia del 29,13% (Pemán et al., 2011).

De los 400 pacientes con candidemia por *Candida parapsilosis sensu lato*, 231 (57,75%) eran hombres, y 169 mujeres (42,25%), con una media de edad de 51 (con una desviación estándar de 29,1) y 47 (con una desviación estándar de 30) años, respectivamente, con edades comprendidas entre los 3 días y los 97 años. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos ($p = 0,436$) (Cantón et al., 2011). Ningún aislamiento de *Candida metapsilosis* ni de *Candida orthopsilosis* estaban implicados en candidemias en neonatos (Cantón et al., 2011).

En el Laboratorio de Micología médica de la UPV/EHU se realizó la identificación por PCR-RFLP de 324 aislamientos de *Candida parapsilosis sensu lato* de los cuales, 297 (91,66%) correspondieron a *Candida parapsilosis sensu stricto*, 24 (7,40%) a *Candida orthopsilosis* y 3 (0,93%) a *Candida metapsilosis* (Figura 4.23).

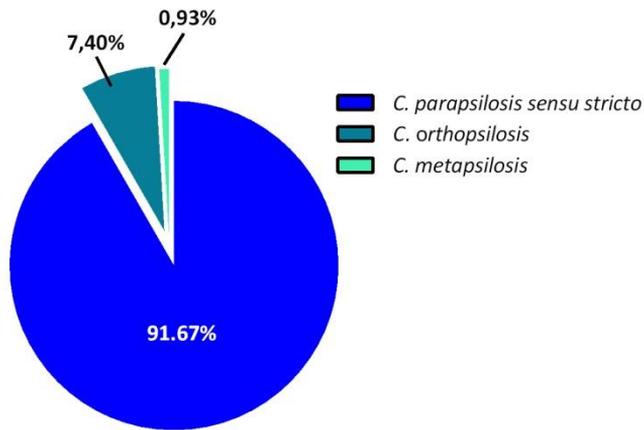


Figura 4.23. Distribución de los aislamientos dentro de las especies del complejo *Candida parapsilosis*.

En un primer análisis de los datos, cabe destacar que la distribución de las especies dentro de *Candida parapsilosis sensu lato* no fue homogénea en todo el país, ni en relación a la comunidad autónoma, ni al centro hospitalario de procedencia (Tabla 4.15 y Figura 4.24). Las comunidades autónomas con mayor número de aislamientos del complejo *Candida parapsilosis* fueron Andalucía y Madrid (con 77 (29,62%) y 75 (25,34%) aislamientos, respectivamente), mientras que el País Vasco ($n = 2$, 5,56) fue donde se registraron menos casos de candidemia por *Candida parapsilosis sensu lato*. *Candida parapsilosis sensu stricto* se aisló de manera más notable en Madrid ($n = 72$, 22,22%), seguida muy de cerca por Andalucía ($n = 71$, 21,91%). La comunidad que registró un mayor número de aislamientos de *Candida orthopsilosis* fue Andalucía con ocho, seguida de Baleares y la Comunidad Valencia con cuatro (1,23%) cada una. Por su parte, *Candida metapsilosis* únicamente se aisló en tres pacientes de dos de las 15 comunidades participantes que fueron Asturias (donde se notificaron dos aislamientos) y Madrid (donde se registró un aislamiento). Únicamente un paciente ingresado en Baleares sufrió una infección mixta por *Candida parapsilosis sensu stricto* y *Candida orthopsilosis*.

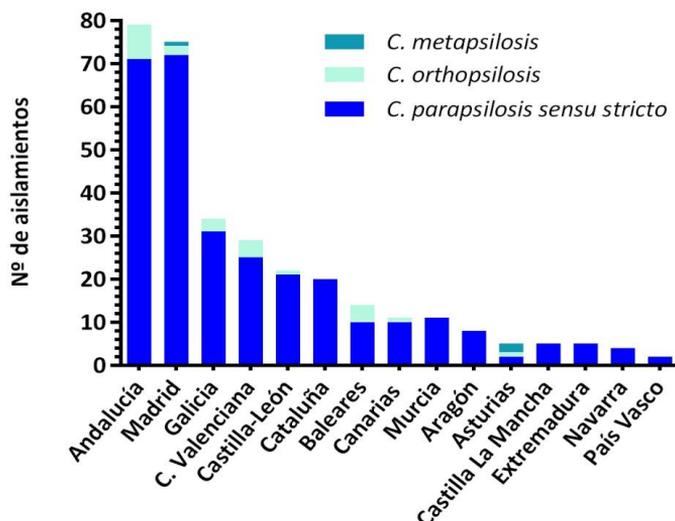


Figura 4.24. Distribución del complejo *Candida parapsilosis* en cada comunidad autónoma.

Tabla 4.15. Distribución de las especies de *Candida parapsilosis sensu lato* por comunidad autónoma.

Comunidad autónoma	Total	Nº de aislamientos n (%)		
		<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>
Andalucía	79 (24,38%)	71 (21,91%)	8 (2,47%)	-
Aragón	8 (2,47%)	8 (2,47%)	-	-
Asturias	5 (1,54%)	2 (0,62%)	1 (0,31%)	2 (0,62%)
Baleares	14 (4,32%)	10 (3,09%)	4 (1,23%)	-
Canarias	11 (3,40%)	10 (3,09%)	1 (0,31%)	-
Castilla y León	22 (6,79%)	21 (6,48%)	1 (0,31%)	-
Castilla-La Mancha	5 (1,54%)	5 (1,54%)	-	-
Cataluña	20 (6,17%)	20 (6,17%)	-	-
Valenciana	29 (8,95%)	25 (7,72%)	4 (1,23%)	-
Extremadura	5 (1,54%)	5 (1,54%)	-	-
Galicia	34 (10,49%)	31 (9,57%)	3 (0,93%)	-
Madrid	75 (23,15%)	72 (22,22%)	2 (0,62%)	1 (0,31%)
Murcia	11 (3,40%)	11 (3,40%)	-	-
Navarra	4 (1,23%)	4 (1,23%)	-	-
País Vasco	2 (0,62%)	2 (0,62%)	-	-
Total	324 (100%)	296 (91,66%)	24 (7,41%)	3 (0,93%)

Los hospitales con mayor número de aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* fueron el Hospital Virgen del Rocío (n = 24) y el Hospital Reina Sofía (n = 23) seguidos del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHU Santiago) (n = 22) y el Hospital San Carlos (n = 21). Solo en el Hospital Central de Asturias se observaron casos de candidemia por las tres especies que conforman el complejo *Candida parapsilosis*. Los centros hospitalarios Virgen del Rocío (n = 5) y el Hospital Universitario Son Dureta (n = 4) fueron los hospitales con mayor número de aislamientos de *Candida orthopsilosis*. En la Tabla 4.16 se detalla la distribución de las especies de *Candida parapsilosis sensu lato* en los hospitales participantes de los cuales se recibieron muestras en nuestro laboratorio.

Tabla 4.16. Distribución de las especies de *Candida parapsilosis sensu lato* en cada hospital.

Comunidad autónoma	Hospital	Aislamientos	Nº de aislamientos (%)		
			<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>
Andalucía	Carlos Haya (CH)	11	11 (15,49%)	-	-
	Puerta Mar (PM)	4	2 (2,82%)	2 (25%)	-
	Reina Sofía (RS)	23	23 (32,39%)	-	-
	Hospital Virgen de Valme (VL)	2	1 (1,41%)	1 (12,5%)	-
	Virgen de la Macarena (VM)	8	8 (11,27%)	-	-
	Virgen de las Nieves (VN)	7	7 (9,86%)	-	-
	Virgen del Rocío (VR)	24	19 (26,76%)	5 (62,5%)	-
Aragón	Clínico de Zaragoza (CZ)	4	4 (50%)	-	-
	Miguel Servet (MS)	4	4 (50%)	-	-
Asturias	Hospital Central (CA)	5	2 (100%)	1 (100%)	2 (100%)
Baleares	Son Dureta (SD)	14	10 (100%)	4 (100%)	-
Canarias	Virgen de la Candelaria (CD)	4	4 (40%)	-	-
	Negrín (DN)	7	6 (60%)	1 (100%)	-
Castilla y León	General de León (LE)	2	2 (9,52%)	-	-
	Salamanca (SA)	14	13 (61,90%)	1 (100%)	-
	Clínico Valladolid (VD)	2	2 (9,52%)	-	-
	Zamora (ZA)	4	4 (19,05%)	-	-
Castilla-La Mancha	Ciudad Real (CR)	5	5 (100%)	-	-
Cataluña	Val d'Hebron (BH)	7	7 (35%)	-	-
	Clínic (CB)	6	6 (30%)	-	-
	San Pau (CP)	6	6 (30%)	-	-
	Parc Taulí (SB)	1	1 (5%)	-	-
Valenciana	Clínico Valencia (CV)	8	7 (28%)	1 (25%)	-
	Dr. Peset (DP)	8	6 (24%)	2 (50%)	-
	General de Castellón (GC)	3	2 (8%)	1 (25%)	-
	Elche (GE)	2	2 (8%)	-	-
	General de Valencia (GV)	8	8 (32%)	-	-
Extremadura	San Pedro (CC)	5	5 (100%)	-	-
Galicia	A Coruña (JC)	7	7 (22,58%)	-	-
	Santiago (ST)	22	19 (61,29%)	3 (100%)	-
	Vigo (XC)	5	5 (16,13%)	-	-
Madrid	San Carlos (CS)	21	20 (27,78%)	1 (50%)	-
	Gregorio Marañón (GM)	15	14 (19,44%)	1 (50%)	-
	Puerta del Hierro (PH)	10	9 (12,5%)	-	1 (100%)
	La Princesa (PR)	2	2 (2,78%)	-	-
	La Paz (PZ)	15	15 (20,83%)	-	-
	Ramón y Cajal (RC)	12	12 (16,67%)	-	-
Murcia	Arrixaca (AX)	11	11 (100%)	-	-
Navarra	Virgen del Camino (UN)	4	4 (100%)	-	-
País Vasco	Basurto (BS)	2	2 (100%)	-	-

d. Comparación y relación de los genotipos aislados en las diferentes comunidades

Empleando el protocolo de PCR múltiple validado en el presente trabajo, se realizó la genotipificación mediante STR de los 297 aislamientos identificados como *Candida parapsilosis sensu stricto*. El análisis de los fragmentos STR obtenidos, permitió diferenciar un total de 156 genotipos, de los cuales 115 (73,72%) únicamente fueron observados una sola vez (genotipo único) y 41 (26,28%) estaban representados por dos o más aislamientos. Se diferenciaron nueve (5,77%) genotipos «específicos» de la Comunidad Autónoma (CA), es decir genotipos presentes en un mismo hospital o en hospitales diferentes dentro de una misma comunidad autónoma y 32 (20,51%) genotipos considerados genotipos «nacionales», en los que el mismo perfil genotípico era común en aislamientos procedentes de al menos dos comunidades autónomas diferentes (Tablas 4.17, 4.18 y 4.19).

Tabla 4.17. Número de genotipos de *Candida parapsilosis sensu stricto* identificados en las diferentes comunidades autónomas.

Comunidad autónoma	Tota l	Genotipo único (%)	Genotipo específico de la CA (%)	Genotipo «nacional» (%)
Andalucía	50	31 (62%)	3 (6%)	16 (32%)
Aragón	7	2 (28,57%)	1 (14,29%)	4 (80%)
Asturias	2	1 (50%)	0	1 (50%)
Baleares	8	4 (50%)	0	4 (50%)
Canarias	10	5 (50%)	0	5 (50%)
Castilla y León	17	8 (47,06%)	1 (5,88%)	8 (47,06%)
Castilla-La Mancha	4	2 (50%)	0	2 (50%)
Cataluña	18	11 (61,11%)	0	7 (38,89%)
Valenciana	21	12 (51,14%)	0	9 (42,86%)
Extremadura	5	3 (60%)	0	2 (40%)
Galicia	20	7 (35%)	1 (5%)	12 (60%)
Madrid	43	22 (51,16%)	3 (6,98%)	18 (41,86%)
Murcia	11	4 (36,36%)	0	7 (63,64%)
Navarra	4	2 (50%)	0	2 (50%)
País Vasco	2	1 (50%)	0	1 (50%)

Tabla 4.18. Genotipos más prevalentes que estaban en diferentes comunidades autónomas.

Genotipo	Nº (%) aislamientos	Fragmentos STR (pb)	Comunidad autónoma
1	33 (11,11%)	236/242 307/307 264/264 138/138	Andalucía, Aragón, Baleares, Castilla y León, Castilla La Mancha, Cataluña, Comunidad Valenciana, Madrid, Murcia
2	20 (6,73%)	222/242 370/370 270/319 135/135	Andalucía, Castilla y León, Castilla La Mancha, Cataluña, Comunidad Valenciana, Galicia, Madrid, Murcia, Navarra
3	13 (4,38%)	222/242 369/369 319/319 134/134	Andalucía, Aragón, Castilla y León, Cataluña, Comunidad Valenciana, Extremadura, Galicia, Madrid
4	10 (3,37%)	222/242 373/373 304/304 134/134	Andalucía, Asturias, Castilla y León, Cataluña, Galicia, Madrid
5	8 (2,69%)	239/239 354/354 272/272 110/110	Andalucía, Comunidad Valenciana, Madrid
6	7 (2,36%)	239/242 400/400 270/301 133/145	Baleares, Galicia, Madrid
7	6 (2,02%)	236/242 307/307 264/281 133/138	Castilla y León, Castilla-La Mancha, Cataluña, Madrid, País Vasco
8	6 (2,02%)	242/242 361/364 267/270 120/134	Andalucía, Comunidad Valenciana, Madrid
9	5 (1,68%)	222/242 369/369 269/269 135/135	Andalucía, Comunidad Valenciana, Galicia, Murcia
10	4 (1,35%)	239/239 307/307 258/258 151/153	Comunidad Valenciana, Madrid, Murcia
11	3 (1,01%)	236/242 307/307 264/281 138/138	Andalucía, Aragón
12	3 (1,01%)	239/242 352/352 273/293 110/110	Andalucía, Baleares
13	3 (1,01%)	242/242 307/307 264/281 133/138	Galicia, Madrid
14	3 (1,01%)	222/242 385/385 270/319 134/134	Madrid, Navarra
15	3 (1,01%)	222/242 370/391 269/319 135/135	Andalucía, Canarias, Galicia
16	3 (1,01%)	222/242 369/369 269/319 134/134	Andalucía, Canarias, Cataluña
17	3 (1,01%)	242/242 369/369 284/303 133/134	Galicia, Madrid, Valencia

Tabla 4.19. Genotipos (implicados únicamente dos aislamientos) que estaban en diferentes comunidades autónomas.

Genotipo	Nº (%) aislamientos	Fragmentos STR (pb)	Comunidad autónoma
18	2 (0,67%)	230/230 348/351 272/272 112/112	Andalucía, Castilla y León
19	2 (0,67%)	236/239 379/379 290/319 135/135	Andalucía, Canarias
20	2 (0,67%)	239/242 352/352 289/289 110/110	Canarias, Madrid
21	2 (0,67%)	239/242 397/397 301/301 135/145	Castilla y León, Madrid
22	2 (0,67%)	242/242 394/394 319/319 133/133	Galicia, Madrid
23	2 (0,67%)	222/242 370/370 337/337 135/135	Andalucía, Galicia
24	2 (0,67%)	219/259 307/307 267/267 155/155	Andalucía, Comunidad Valenciana
25	2 (0,67%)	222/239 307/307 258/258 151/153	Cataluña, Extremadura
26	2 (0,67%)	222/242 370/391 269/269 134/134	Galicia, Murcia
27	2 (0,67%)	222/242 373/373 304/315 135/135	Castilla y León, Madrid
28	2 (0,67%)	239/239 323/323 253/269 151/152	Galicia, Murcia
29	2 (0,67%)	239/242 323/323 253/253 151/151	Baleares, Extremadura
30	2 (0,67%)	236/242 307/319 264/264 138/138	Canarias, Madrid
31	2 (0,67%)	236/242 307/307 264/264 119/138	Andalucía, Aragón
32	2 (0,67%)	242/242 373/373 305/305 134/134	Madrid, Murcia
CCAA	19 (6,40%)	-	Andalucía, Aragón, Castilla y León, Galicia, Madrid
Único	115 (38,72%)	-	

Tanto Andalucía (n = 50) como Madrid (n = 43) fueron las comunidades que presentaron un mayor número de genotipos diferentes, lo que concuerda con los datos de distribución, ya que estas dos comunidades también fueron las comunidades con mayor prevalencia de aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto*. Únicamente cinco comunidades mostraron genotipos específicos de la comunidad autónoma a la que pertenecían: Andalucía y Madrid con tres genotipos cada uno, seguidas de Aragón, Castilla y León, y Galicia todos ellas con un genotipo específico de comunidad (Figura 4.25).

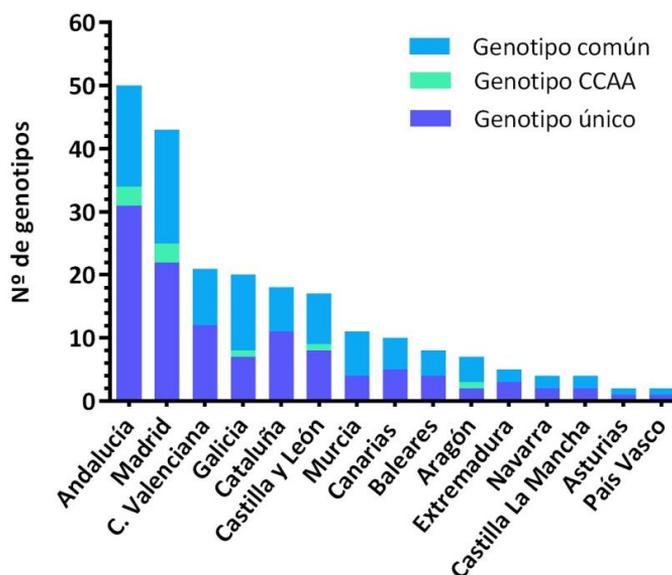


Figura 4.25. Número de genotipos observados en las diferentes comunidades autónomas.

En cuanto a los genotipos presentes en diferentes comunidades autónomas, referidos a ellos como genotipos «nacionales», se observaron 32 genotipos diferentes (Tablas 4.17 y 4.18). Al igual que ocurría con el número total de genotipos, Andalucía y Madrid siguieron siendo las comunidades que mayor número de genotipos «nacionales» presentaron con la salvedad de que, en este caso, Madrid se situó por delante de Andalucía, con 18 frente a 16 genotipos de distribución «nacional».

De los 32 genotipos «nacionales» identificados, tres de ellos (denominados arbitrariamente 1, 2 y 3 por orden de número de casos) fueron los más prevalentes con un total de 33

(11,11%), 20 (6,73%) y 13 casos (4,38%), respectivamente. Sin embargo, su distribución no fue homogénea aislándose en nueve y ocho (genotipos 2 y 3) CCAA, respectivamente (Figura 4.26).

Centrándonos en los genotipos más prevalentes, la distribución geográfica del genotipo 1 incluía el centro, sur y este de la Península, incluyendo las Islas Baleares, pero exceptuando Extremadura. Por su parte el genotipo 2 presentó una ubicuidad mayor al estar presente en toda la geografía española ya que se identificaron cepas con este genotipo en el norte (Galicia y Navarra), centro (Castilla y León, y Madrid), sur (Andalucía y Murcia) y este (Cataluña y Comunidad Valenciana) de España. Una distribución geográfica similar se observó con el genotipo 3 presente también en el norte (Galicia), centro (Castilla y León, Extremadura y Madrid), sur (Andalucía) y este (Aragón, Cataluña y Comunidad Valenciana) de la Península. Asimismo, se identificaron dos genotipos (21 y 27) que fueron característicos de la zona centro de España, observados únicamente en Castilla y León, y Madrid (Tabla 4.18).

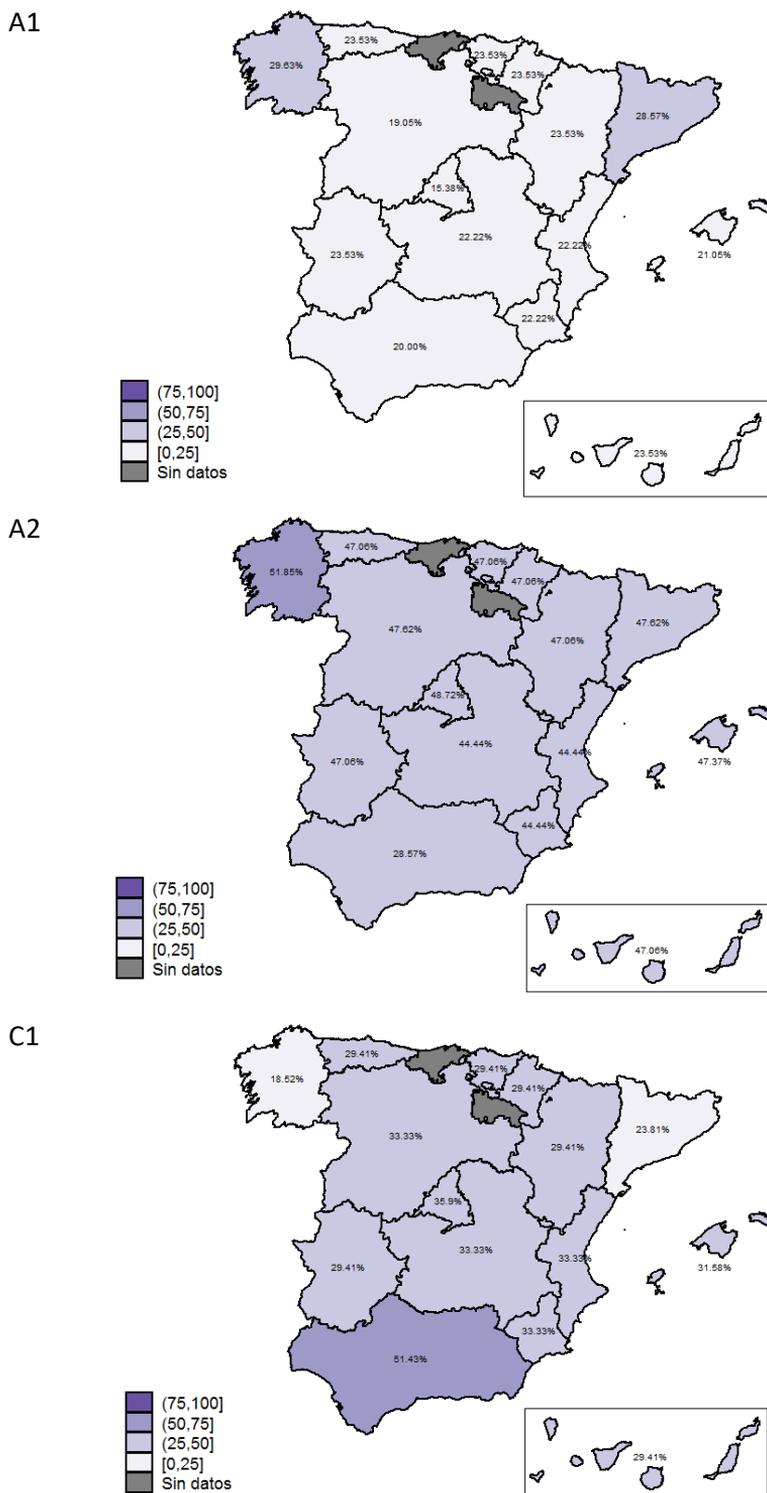


Figura 4.26. Distribución porcentual de los *clusters* (A1, A2 y C1) de genotipos más prevalentes por CCAA.

El dendrograma realizado a partir de los perfiles genotípicos de cada una de las cepas de *Candida parapsilosis sensu stricto* mostró tres grupos o *clusters* claramente diferenciados.

El *cluster* A estaba a su vez subdividido en dos subclados (A_1 y A_2). Doscientos un aislamientos (67,68%) conformaban dicho grupo, con 21 genotipos comunes a diferentes comunidades y siete genotipos específicos de comunidad.

El *cluster* B, al igual que el *cluster* A estaban subdividido en dos clados (B_1 y B_2). Un único aislamiento integraba el subclado B_2 . Este grupo fue el más pequeño de todos al estar conformado únicamente por cuatro aislamientos (1,35%). Ningún genotipo de los considerados prevalentes formaban parte de este *cluster*.

Por último, el *cluster* C estaba dividido en tres subclados (C_1 , C_2 y C_3), a diferencia del resto de grupos. A este grupo pertenecieron 92 aislamientos (30,98%) además incluía 11 genotipos comunes a diferentes comunidades y dos genotipos específicos de comunidad, en este caso estos dos genotipos pertenecían a tres hospitales de la comunidad de Andalucía. El subgrupo C_3 estaba conformado por un único aislamiento (VR28) que procedía de un paciente de la Comunidad de Madrid.

- **Producción de biopelículas**

El estudio de la producción de biopelículas de los aislamientos identificados como *Candida parapsilosis sensu stricto* con el método de crecimiento en ARC, determinó que un total de 218 aislamientos (73,40%) producían biopelícula (Tabla 4.20). De estos, 204 aislamientos (68,69%) mostraban una fuerte capacidad de producción (colonias negras o rojas) y 14 una capacidad débil (colonias rosas).

Tabla 4.20. Producción de biopelículas en Agar rojo Congo.

Especie	n	Nº de aislamientos con producción de biopelículas (%)			
		Fuerte (+)	Débil (+)	Negativa	Mixta ¹
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	297	204 (68,69%)	14 (4,71%)	17 (5,72%)	62 (20,88%)

¹ Para un mismo aislamiento, indica la presencia de ambos fenotipos (positivo y negativo).

Al relacionar la capacidad de formación de biopelículas (fenotipo) y los genotipos predominantes identificados (17 genotipos observados en más de dos aislamientos y comunidades), se observó que todas las cepas de *Candida parapsilosis sensu stricto* con genotipos 5, 7, 8, 10, 11, 12 y 13 mostraron fenotipos productores de biopelícula, mientras que todos los aislamientos con genotipo 15 mostraron fenotipos mixtos. En cuanto a los genotipos 1 y 2, los más prevalentes, 31 aislamientos con genotipo 1 (93,94%) presentaron capacidad productora de biopelículas y dos aislamientos (6,06%) mostraron fenotipos mixtos. Ningún aislamiento con genotipo G1, mostró fenotipo negativo en ARC. En el caso del genotipo G2 la distribución de estos fenotipos fue más heterogénea ya que siete aislamientos (35%) fueron productores de biopelícula, cinco (25%) no mostraron dicha capacidad y el 40% restante presentaron fenotipos mixtos (ver Tabla 4.21).

Tabla 4.21. Relación entre genotipo y producción de biopelícula.

Genotipo	Nº de aislamientos	Nº de aislamientos (%) productores de biopelícula		
		Fenotipo +: colonias negras-rojas; rosas	Fenotipo -: colonias blancas	Fenotipo mixto ¹
1	33	31 (93,94%)	-	2 (6,06%)
2	20	7 (35%)	5 (25%)	8 (40%)
3	13	6 (46,15%)	1 (7,69%)	6 (46,15%)
4	10	5 (50%)	1 (10%)	4 (40%)
5	8	8 (100%)	-	-
6	7	4 (57,14%)	-	3 (42,86%)
7	6	6 (100%)	-	-
8	6	6 (100%)	-	-
9	5	4 (80%)	-	1 (20%)
10	4	4 (100%)	-	-
11	3	3 (100%)	-	-
12	3	3 (100%)	-	-
13	3	3 (100%)	-	-
14	3	2 (66,66%)	-	1 (33,33%)
15	3	-	-	3 (100%)
16	3	1 (33,33%)	1 (33,33)	1 (33,33%)
17	3	2 (66,67%)	-	1 (33,33%)
Otros	49	39 (79,59%)	4 (8,16%)	6 (12,24%)
Único	115	84 (73,04%)	5 (4,35%)	26 (5,22%)
Total	297	218 (73,40%)	17 (5,72%)	62 (20,88%)

¹ Para un mismo aislamiento indica la presencia de fenotipos positivos y negativos.

- **Sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos**

De los 297 aislamientos analizados, únicamente se detectaron cinco aislamientos (1,68%) con una sensibilidad reducida a alguna de las equinocandinas estudiadas, y un aislamiento (0,34%) presentó una sensibilidad dosis dependiente a anidulafungina y micafungina. De estos cinco aislamientos, cuatro (80%) fueron resistentes a la micafungina y un aislamiento (20%) resistente a la anidulafungina, con valores de CMI superiores a 8 µg/ml. Ningún aislamiento mostró una sensibilidad reducida a la caspofungina.

Los aislamientos no se encontraron repartidos uniformemente entre los *clusters* en los que se agruparon en función de sus perfiles genotípicos. Tres aislamientos (50%) pertenecían al

cluster A y los otros tres al *cluster C*. Ningún aislamiento con valores de CMI superiores a 8 µg/ml correspondió al *cluster B* (Tabla 4.22).

En ninguno de los aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* resistentes o SDD se encontraron mutaciones en las regiones HS1 y HS2 de los genes *FKS1* y *FKS2*. Sin embargo, en tres de los aislamientos con una sensibilidad reducida a las equinocandinas (50%), se detectaron mutaciones heterocigotas próximas a las regiones HS1 y HS2 del gen *FKS1*. Los otros tres aislamientos restantes tenían mutaciones cercanas a las regiones HS del gen *FKS2*. Las mutaciones encontradas, así como la información de la sensibilidad in vitro a las equinocandinas de los aislamientos descritos se detallan en la Tabla 4.22.

Tabla 4.22. Valores de CMI para cada una de las equinocandinas estudiadas de los aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* resistentes o sensibles dosis dependiente.

Aislamiento	Cluster	Subgrupo	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)			Sustituciones aminoacídicas	
			ANF ¹	MCF	CAS	<i>FKS1</i>	<i>FKS2</i>
RS16	A	A ₁	4	8	2	WT ²	WT
CB26		A ₂	1	16	0,5	WT	N1169D
VM08			4	4	0,5	WT	C1213R,L1216L
CB27	C		1	16	0,25	S745L	N1169D
RS16A		C ₁	4	8	2	A586D, S1314S, F1417Y, S1461A, L1474L, F1478L	WT
ST14		C ₂	8	4	2	S1314S	WT

¹ANF, anidulafungina; MCF, micafungina; CAS, caspofungina; ²WT, genotipo salvaje (*Wild Type*).

c. Análisis de la información contenida en las regiones analizadas para la tipificación molecular

En el estudio realizado con los cuatro marcadores estudiados, se obtuvieron un total de 172 alelos diferentes, con una media del número de alelos por *locus* (NMA) de 45,50. De los cuatro marcadores de tipo STR analizados con respecto a la población de estudio, CP4 fue el que mayor variabilidad presentó en cuanto al número de alelos diferentes, con 65, mientras que el marcador CP1 fue el que menos, con 24 (Tabla 4.23).

Tabla 4.23. Alelos obtenidos para cada uno de los *loci* estudiados.

<i>Locus</i>	Tamaño de los alelos	Nº de alelos	Frecuencia de repetición alélica	Frecuencia alélica ¹
CP1	208-270	24	1-251	0,0017-0,4226
CP4	282-448	47	1-148	0,0017-0,2492
CP6	218-345	65	1-98	0,0017-0,1650
B5	103-169	36	1-135	0,0017-0,2273

¹ Valores mínimos y máximos.

Análogamente a lo realizado en el ensayo de efectividad, se calcularon las frecuencias alélicas de cada uno de los alelos identificados, empleando el software Microsatellite Toolkit (Park, 2001), con el fin de determinar la eficiencia de los marcadores genéticos seleccionados mediante el cálculo de los parámetros estadísticos, PIC, PD, índice de heterocigosidad y la entropía que se resumen en la Tabla 4.24.

Tabla 4.24. Parámetros estadísticos que informan de la eficiencia de la técnica STR.

Parámetros	CP1	CP4	CP6	B5	CP1+CP4+CP6+B5 ¹
Contenido de información polimorfa (PIC)	0,729	0,877	0,920	0,802	0,990
Índice de Simpson (PD)	0,755	0,887	0,925	0,815	0,990
Heterocigosidad observada	0,771	0,279	0,508	0,313	-
Heterocigosidad esperada	0,744	0,899	0,938	0,882	-
Estimación no sesgada de la heterocigosidad	0,756	0,889	0,926	0,817	0,991
Entropía (en bits)	2,250	3,613	3,999	3,179	7,649

¹Parámetros estimados para la globalidad de los marcadores empleados.

Basándonos en los resultados obtenidos, CP6 resultó ser el marcador que presentó mayor poder informativo en la población de estudio con un valor de PIC de 0,934, mientras que CP1 fue el marcador que mostró el valor de PIC menor, 0,711. En cuanto a la capacidad de diferenciar genéticamente aislamientos fúngicos no relacionados y tomados al azar (PD), CP6 fue el marcador que presentó una mayor capacidad, con un valor de PD de 0,925. La globalidad de los marcadores empleados mostró un PD igual a 0,990, demostrando el alto poder discriminatorio de la técnica.



DISCUSIÓN

5. Discusión

Candida parapsilosis es un agente etiológico de candidiasis tanto superficiales como invasoras. Se ha asociado con varios brotes de infecciones nosocomiales en los que resalta su capacidad para adherirse, colonizar y desarrollar biopelículas tanto en superficies abióticas de los dispositivos médicos la piel y mucosas del personal sanitario. Estas propiedades de *Candida parapsilosis* facilitan su papel patógeno en las infecciones asociadas a los cuidados de la salud y hace que esta especie tenga una especial relevancia en las candidiasis invasoras en las UCI neonatales. *Candida parapsilosis* se propaga y persiste en el ambiente hospitalario causando complicaciones graves en los pacientes críticos (Magobo et al., 2017; Trofa et al., 2008). Un objetivo importante en la lucha contra estas candidiasis es el desarrollo de métodos de diagnóstico y herramientas para el estudio epidemiológico (métodos de genotipificación) que posibiliten el establecimiento temprano del tratamiento más adecuado y de las medidas necesarias para la prevención, control y contención de estas enfermedades (Sabino et al., 2015).

Se han descrito numerosos métodos para tipificar los aislamientos clínicos del género *Candida*, basados en técnicas muy distintas, como el análisis isoenzimático, la electroforesis en campo pulsado (PFGE), amplificación mediante PCR con o sin procesamiento posterior con enzimas de restricción (*Random Amplified Polymorphic DNA –RAPD-*), rep-PCR o *Restriction Fragment Length Polymorphism –RFLP-*) y secuenciación de regiones conservadas del genoma, como las regiones ITS o los esquemas de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) basados en una serie de genes constitutivos (*Housekeeping*) de *Candida*. Sin embargo, ninguna de las técnicas mencionadas tiene un poder discriminatorio superior al de la genotipificación mediante análisis de fragmentos amplificados de regiones que contienen microsatélites (STR) (Magobo et al., 2017; Romeo et al., 2013; Raquel Sabino et al., 2010).

La sencillez técnica de la genotipificación basada en STR y su potencialmente asequible automatización, lo han convertido en un método de referencia en la tipificación de aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto* (Magobo et al., 2017; Romeo et

al., 2013). Esta técnica, permite la realización de estudios filogenéticos con una aplicación directa al estudio de brotes de candidiasis nosocomiales o a la detección de cambios microevolutivos experimentados por algunos aislamientos de *Candida* durante la colonización de los dispositivos médicos o durante el desarrollo de las infecciones candidiásicas invasivas. Esta herramienta molecular puede tener una utilidad clínica mayor en el estudio de las posibles vías de transmisión de los agentes patógenos, así como convertirse en una pieza fundamental para el estudio de un brote infeccioso hospitalario y establecer un diagnóstico correcto (Riboli et al., 2014; Shin et al., 2004).

Hasta el momento, la mayoría de las técnicas de genotipificación basadas en STR para *Candida parapsilosis sensu stricto* toman como modelo, con mínimas modificaciones, la técnica descrita por Sabino y colaboradores en 2010 (Diab-Elschahawi et al., 2012; Romeo et al., 2013; Sabino et al., 2010; Vaz et al., 2011; Wang H, Zhang L, Kudinha T, Kong F, Ma X-J, 2016). Aunque el poder discriminativo de la misma es óptimo, es una técnica relativamente laboriosa ya que cada uno de los cuatro marcadores STR empleados se procesan por separado en reacciones de PCR *singleplex* o a lo sumo ,en parejas de estos. Además, presenta ciertas peculiaridades que dificultan la estandarización de la misma, como el alto tamaño de los fragmentos obtenidos para los *loci* CP1, CP4 y CP6. Diab-Elschahawi y colaboradores (2012) llevaron a cabo el rediseño de los tres *loci* con el objetivo de generar productos de PCR más pequeños y poder amplificarlos en una única PCR. Esa misma estrategia fue seguida por Vaz y colaboradores (2011), pero en este caso únicamente realizaron el rediseño del cebador para la amplificación de CP4. Las temperaturas de hibridación de los cebadores diseñados por Sabino y colaboradores (2010) son dispares, lo que dificulta realmente la amplificación de todos los *loci* a la vez, por lo que la estrategia de rediseñar los cebadores puede ser una solución para disminuir ese inconveniente.

Un objetivo importante de este trabajo ha sido desarrollar y validar un protocolo de PCR múltiple que sea eficaz, fiable y de alto rendimiento, con una posibilidad real para ser automatizado, y que se pueda adaptar a la genotipificación satisfactoria de los aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto*. Hasta ahora, no hay en la literatura un trabajo de validación completo como el desarrollado a lo largo de este trabajo, existiendo

únicamente validaciones parciales centradas sobre todo en el poder discriminatorio de los marcadores STR escogidos para el análisis de fragmentos (Brillowska-Dabrowska et al., 2009; Diab-Elschahawi et al., 2012; Pulcrano et al., 2012; Sabino et al., 2010).

Gracias a este enfoque, este trabajo presenta aspectos innovadores en el proceso de optimización de las reacciones de PCR en formato múltiple. Para esto, no sólo es necesario llevar a cabo un ajuste preciso de la concentración óptima de los cebadores, de los cationes bivalentes ($MgCl_2$) o dNTP. También, requiere llevar a cabo una elección de una enzima polimerasa que es crucial para obtener resultados satisfactorios. La falta de especificidad de dos de las enzimas probadas, TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version y KAPA2G Fast Multiplex PCR kit, es un limitante importante para su uso para la genotipificación de los aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto*. La aparición de resultados falsamente positivos merma la especificidad y los valores predictivos de una prueba diagnóstica cualquiera (Santabárbara-Serrano et al., 2016) lo que redundaría en el uso de pruebas adicionales, si las hubiera, para garantizar un diagnóstico de exclusión de la enfermedad, la candidemia por *Candida parapsilosis* en este caso). Esto es especialmente importante cuando la falta de exclusión del diagnóstico de candidemia conlleva, como aconsejan las actuales guías de tratamiento, la instauración de un tratamiento antifúngico empírico con equinocandinas, azoles o anfotericina B, que son fármacos que no están exentos de toxicidad e interacciones farmacológicas e incluso la retirada del catéter venoso central (Pappas et al., 2016), en pacientes que están recibiendo otros tratamientos farmacológicos concomitantes, cuando podría ser innecesaria la adopción de estas medidas si tuviéramos una herramienta de diagnóstico adecuada.. Además, el diagnóstico incorrecto podría generar aún más variabilidad en el manejo y tratamiento de la candidemia (Jack et al., 2016). Una consecuencia son los posibles efectos en la seguridad del paciente al someterlo a terapias que podrían no ser necesarias, así como del posible impacto, difícil de estimar, de los tratamientos antifúngicos innecesarios en la selección de mutantes resistentes a estos fármacos, con el agravamiento del gran problema mundial de las resistencias a los fármacos antimicrobianos o mediante la selección de especies multirresistentes, como *Candida auris*,

que se están asociando con mayor frecuencia con brotes de candidiasis nosocomiales graves (Perlin et al., 2017; Ruiz Gaitán et al., 2017; Sears & Schwartz, 2017).

Sin embargo, el uso de un protocolo de PCR múltiple rápido, fiable y específico con la enzima AmpliTaq Gold® DNA Polymerase resulta ser satisfactorio tanto desde el punto de vista microbiológico al garantizar la fiabilidad de los resultados ofrecidos por la prueba diagnóstica, como desde el punto de vista clínico por el alto valor predictivo negativo que ha demostrado esta prueba en el presente estudio de Tesis.

La validación de este nuevo protocolo en condiciones ideales y en condiciones reales (empleando cepas de referencia o muestras clínicas, evaluando su eficacia y efectividad dio como resultado unos valores de sensibilidad y especificidad del 100% (IC 95% de 0,158, 1 y de 0,753, 1, respectivamente), con una concordancia perfecta entre ambas técnicas. Sin embargo, la amplitud de los intervalos de confianza nos hace ser cautos ya que indica que el tamaño de la muestra podría ser demasiado pequeño para obtener una adecuada potencia estadística y de ahí el descenso de la precisión demostrable por la amplitud de los intervalos de confianza. A pesar de ello creemos que los resultados obtenidos son positivos y que el aumento del tamaño de la muestra no influiría demasiado en los valores que estiman la sensibilidad y especificidad, garantizando en cierto modo, que el nuevo protocolo es similar al original en cuanto a precisión y fiabilidad, aunque mucho menos laborioso.

Como ventajas de la aplicación del nuevo protocolo de genotipificación cabe destacar:

- 1) La disminución del tiempo de manejo.
- 2) El acortamiento del tiempo hasta la obtención de resultados.
- 3) La simplificación de la técnica ya que se pueden analizar los fragmentos de PCR obtenidos de las cuatro regiones donde se sitúan los marcadores en un mismo paso.
- 4) La posibilidad de automatización de la técnica con lo que se avanzaría en la estandarización.

Como posibles desventajas del nuevo protocolo cabe citar el aumento del coste por reacción en comparación con el original, en el caso de que cada uno de los cebadores *forward* se marcasen con diferentes fluorocromos para realizar la reacción múltiple. Sin embargo, este hecho puede ser evitado en parte, ya que los marcadores con productos de PCR muy dispares podrían ser marcados con el mismo fluorocromo sin verse alterados los resultados. Otra desventaja, es la disminución de la relación señal/ruido a la hora de obtener los electroferogramas durante el análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar. Este hecho tuvo lugar en los primeros pasos de la optimización; sin embargo, fue mediante la incorporación de adaptaciones sucesivas como las descritas, o con el empleo de medidas adicionales basadas en la transformada rápida de Fourier (FFT) (Material suplementario 8.1) que Covarrubias-Pazaran y colaboradores (2016) han aplicado de una manera satisfactoria.

La genotipificación por STR de los aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto* de origen sanguíneo y de la punta del catéter procedentes de pacientes con sospecha de sufrir una CRC empleando el protocolo de PCR múltiple propuesto, permitió identificar con certeza estas infecciones al relacionar las muestras tanto de sangre como de catéter en función de su genotipo. De acuerdo con los criterios clínicos establecidos por los CDC (Centers for Disease Control (CDC)/National Healthcare Safety Network (NHSN), 2017), en lo referente a la prevención de infecciones relacionadas con el uso de catéteres intravasculares, el único tipo de infección que puede considerarse una infección relacionada a catéter (IRC), es aquella en la que además de observarse síntomas clínicos claros de sepsis (fiebre, escalofríos, etc.) sin otro foco aparente, se identifica la misma especie en el cultivo de la zona de inserción del catéter o en la muestra de la punta de catéter y en el hemocultivo de sangre periférica (O'Grady et al., 2011). Sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo se plantea la incógnita de si es suficiente la realización del cultivo de las muestras para determinar con certeza una IRC. Por ejemplo, se puede dar el caso de obtener aislamientos clínicos de la misma especie en el cultivo de catéter y en el hemocultivo de sangre periférica pero ser estos aislamientos genotípicamente diferentes. Este hecho nos indicaría que realmente no estamos ante el mismo agente etiológico y que

por lo tanto el origen de la fungemia podría ser uno diferente al del catéter. Esto sería más evidente en aquellos pacientes con más de un factor de riesgo de sufrir candidiasis. Por lo tanto, además de los datos clínicos y epidemiológicos, la genotipificación por STR nos permitiría identificar otras posibles fuentes de infección o dilucidar diferentes mecanismos de transmisión de la infección por *Candida parapsilosis sensu stricto*. En el estudio de Tesis realizado, los 35 pacientes sufrían una CRC según los criterios clínicos y de técnicas microbiológicas convencionales de los CDC (Centers for Disease Control -CDC-/National Healthcare Safety Network -NHSN-, 2017). Sin embargo, cuando se realizó la genotipificación por STR de los aislamientos de *Candida parapsilosis* se comprobó que esto sólo era cierto en dos tercios de los pacientes (77,14%) que presentaban aislamientos idénticos en las muestras estudiadas de sangre y punta del catéter.

La caracterización de aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* genéticamente relacionados y asociados a CRC que se han cultivado de muestras clínicas de diferentes pacientes que estaban ingresados en el mismo hospital, e incluso en una misma unidad de hospitalización, a lo largo de diferentes años, podría reforzar la idea propuesta por Romeo y colaboradores (2013) o Barbedo y colaboradores (2015) sobre la adquisición desde el ambiente hospitalario de este microorganismo o de la posible contaminación cruzada facilitada por el personal sanitario que está en contacto con los pacientes que puede haber sido colonizado por estos aislamientos de *Candida parapsilosis*. Además, no hay que desechar la posible asociación de estos genotipos con brotes nosocomiales (Asmundsdóttir et al., 2008; Barbedo et al., 2015; Romeo et al., 2013). La técnica de genotipificación basada en STR propuesta en nuestro trabajo de Tesis de doctorado podría tener cabida en la práctica clínica diaria para establecer los posibles mecanismos de transmisión de la infección y frenar el círculo vicioso que se establece.

Así mismo, hemos estudiado las posibles asociaciones entre el genotipo detectado en los aislamientos asociados a CRC y determinados factores de virulencia fúngicos, como la producción de biopelículas o la resistencia a los fármacos antifúngicos. A pesar de que únicamente se pudo observar este hecho con los aislamientos incluidos en el clado o *cluster* A, destacaba que todos los aislamientos incluidos en el subclado A₁ fueron sensibles al

fluconazol, mientras que los aislamientos que se encontraban completamente separados del resto de los *clusters* (CP542 y CP542B) y aquellos que estaban englobados en el subclado A₂, eran inhibidos por unas CMI altas de fluconazol, siendo incluso el aislamiento CP542 resistente al mismo). El escaso número de aislamientos resistentes o con sensibilidad reducida a fluconazol encontrados durante el presente estudio, no nos ha permitido obtener una evidencia fiable de la utilidad de esta técnica como posible marcador de resistencia. Sin embargo, como sugieren Magobo y colaboradores (2017), las regiones microsatélites podrían ser empleadas como marcadores de resistencia a determinados fármacos antifúngicos, sobre todo a partir de una muestra directa. Este estudio de Tesis, como el estudio de vigilancia de candidemias en Sudáfrica de Magobo y colaboradores (2017) se ha centrado en la la genotipificación por STR de aislamientos clínicos, con el objetivo de proporcionar una evidencia molecular de los casos persistentes de candidemia. Los datos obtenidos sugieren la existencia de una posible asociación entre *clusters* específicos y la resistencia a fluconazol, sin ser ésta asociación determinante.

El otro factor de virulencia estudiado, la producción de biopelículas, mostró que los aislamientos clínicos aislados de las puntas de catéter procedentes de pacientes con CRC presentaban una mayor capacidad formadora de biopelículas. Este hallazgo refuerza el hecho de que una de las principales características de esta especie fúngica, la capacidad de producir biopelícula se relaciona con la mayor adhesión de *Candida parapsilosis* a los dispositivos biomédicos (Del Pozo & Cantón, 2016; Kuhn et al., 2004; Ramage et al., 2006). A pesar de la asimetría existente en nuestro estudio entre el número de casos de pacientes que sufrían o no una CRC, hay una evidencia estadística de que los aislamientos pertenecientes a uno y otro grupo difieren en cuanto a la producción de biopelícula. El aumento del tamaño de la muestra haría más evidentes estas diferencias, si bien cabe la posibilidad de que al estudiar una muestra de conveniencia esta estuviese sesgada y no hubiera tal asociación.

Además de permitir elucidar casos de CRC, la genotipificación por STR permitió la detección de infecciones policlonales al identificar genotipos adicionales en una misma muestra clínica e incluso infecciones mixtas por especies diferentes, o conjunción de dos especies del

complejo *Candida parapsilosis*. En nuestro caso, se observaron genotipos adicionales en una muestra sanguínea y en una muestra de catéter. El genotipo adicional encontrado en la muestra de catéter podría ser consecuencia de la manipulación del catéter; sin embargo, el genotipo adicional encontrado en la muestra de sangre sugeriría otro origen diferente o adicional de la candidemia.

Un problema etiológico por dilucidar la existencia de candidiasis mixtas, en general, y de aquellas causadas por *Candida parapsilosis sensu stricto* y *Candida orthopsilosis*, en particular. En este estudio de Tesis, a pesar del bajo tamaño de la muestra, un 16,67% de los pacientes presentaron infecciones causadas por estas dos especies. Otros estudios han descrito la presencia de candidiasis mixtas en las que estaban implicadas especies del complejo *Candida parapsilosis*. Sin embargo, no se había descrito que ninguna de las especies de *Candida parapsilosis sensu lato* incluidas en el clado estuviera involucrada en candidiasis mixtas sistémicas (Barbedo et al., 2015; Escribano et al., 2014; Feng et al., 2012) hasta que Barbedo y colaboradores (2015), estudiando aislamientos de *Candida parapsilosis sensu lato* obtenidos de sangre y punta de catéter observaron, al igual que en nuestro trabajo, la presencia de infecciones mixtas o polifúngicas sistémicas causadas por *Candida parapsilosis*. Poder identificar IRC debidas a más de una especie es de vital importancia para llevar a cabo un correcto diagnóstico y establecer una pauta de tratamiento adecuada.

Como aplicación clínica del nuevo método en estudios de relaciones filogenéticas, se llevó a cabo la genotipificación de aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* procedentes de muestras clínicas de sangre recogidas en el estudio observacional prospectivo FUNGEMYCA, realizado en España a lo largo de los años 2009 y 2010 (Cantón et al., 2011; Pemán et al., 2011). De los 297 aislamientos de sangre de *Candida parapsilosis sensu stricto* genotipificados, se identificaron un total de 156 genotipos diferentes. El análisis de las relaciones filogenéticas permitió diferenciar entre genotipos propios de algunas de las comunidades autónomas (genotipos endémicos) y genotipos comunes entre diferentes comunidades participantes en el estudio (genotipos epidémicos). Se identificaron 32 genotipos epidémicos en diferentes comunidades autónomas distribuidos de una manera

no homogénea a lo largo de la toda la geografía española. Estos genotipos comunes mostraron diferentes distribuciones, observándose genotipos característicos de las regiones centro y sureste, del centro, y genotipos que estaban distribuidos por todo el país.

Madrid y Andalucía fueron las comunidades que más genotipos compartieron con el resto de comunidades y a su vez también fueron las comunidades que mayor número de genotipos propios de comunidad presentaron. Esto concuerda con el hecho de que ambas fueron las comunidades que mayor número de aislamientos presentaron y con que ambas comunidades tienen hospitales donde se realizan procedimientos complejos tales como trasplantes de órganos sólidos tanto en adultos como en pacientes pediátricos, lo que justifica en parte la mayor prevalencia de este tipo de infecciones en estas localizaciones. En este estudio, al igual que se observó en el estudio observacional anterior (Cantón et al., 2011; Pemán et al., 2011), se detectaron infecciones policlonales al identificar genotipos adicionales en cuatro muestras (1,35%) y un caso aislado de infección mixta por *Candida parapsilosis sensu stricto* y *Candida orthopsilosis*.

Al relacionar los genotipos identificados en los dos estudios observacionales llevados a cabo en este trabajo de Tesis, observamos que salvo uno de los genotipos, el resto de los genotipos prevalentes identificados en muestras procedentes de pacientes que sufrían CRC también fueron observados entre las muestras procedentes del estudio FUNGEMYCA, dando a entender la posible presencia de genotipos epidémicos circulantes y persistentes a lo largo de varios años en diferentes comunidades autónomas. Al trasladar dicha comparación a diferentes países, es decir, al comparar los genotipos encontrados en nuestro estudio con los publicados por otros autores (Delfino et al., 2014; Romeo et al., 2013; R. Sabino et al., 2015), la presencia de genotipos epidémicos podría ser relevante. Sin embargo, en algunos casos la comparación no es factible. Como se ha comentado anteriormente, muchos de los trabajos basados en la genotipificación mediante STR de aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* rediseñan alguno de los cebadores empleados, por lo que el tamaño de partida de los alelos obtenidos es diferente a los nuestros, lo que dificulta o imposibilita la comparación directa de los estudios. Basándonos en artículos que llevan a cabo la genotipificación de los aislamientos de *Candida parapsilosis*

tomando como referencia la técnica de Sabino y colaboradores (2010), aparecen genotipos filogenéticamente relacionados con cepas del estudio FUNGEMYCA. Sin embargo, no se han observado genotipos idénticos a los identificados en este trabajo (Delfino et al., 2014; Romeo et al., 2013; Sabino et al., 2015; Sabino et al., 2010; Wang et al., 2016).

No se ha obtenido ninguna evidencia de que la genotipificación mediante el análisis de los cuatro *loci* estudiados suponga una ventaja para definir marcadores de resistencia de los aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto* estudiados. Este hecho puede deberse a que, el número de aislamientos que muestran una sensibilidad reducida a las equinocandinas es limitado (seis aislamientos de los 297 estudiados-2%-), lo que limita la potencia de este estudio en su objetivo de encontrar diferencias en este aspecto. Además, el análisis del dendrograma obtenido reveló que estos seis aislamientos no se situaban en el mismo clado, sino que pertenecían a clados distintos aunque se podía apreciar una cierta similitud ya que los aislamientos situados en el clado A1 tenían mutaciones en el gen *FKS2* mientras que, por el contrario, los situados en el clado A2 tenían mutación en el gen *FKS1*, a excepción del aislamiento CB27 que exhibía mutaciones en ambos genes. La pertenencia a un determinado clado podría orientar a considerar que esos aislamientos presentarían una sensibilidad reducida a algunas de las equinocandinas, si bien no es determinante. Son necesarios estudios adicionales con la incorporación de otras familias de fármacos antifúngicos, un diseño epidemiológico más robusto, un número de aislamientos elevado y probablemente con base multicéntrica de distribución mundial, para asegurar la adecuada validez interna y externa del mismo y garantizar la adecuada validación de la presente técnica como marcador de sensibilidad reducida a los fármacos antifúngicos, tomando en consideración criterios epidemiológicos y guías de consenso publicadas sobre esta temática (Cohen et al., 2016; Rothman et al., 2014).

A pesar de los logros descritos, este trabajo de Tesis también presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, conviene señalar que la muestra de conveniencia escogida para la valoración de la eficacia y la efectividad no es el mejor modelo a seguir desde el punto de vista de la teoría de muestreo, ya que no garantiza la adecuada representatividad de la población a estudiar limitando por tanto la generalización de nuestros resultados al conjunto

de las candidemias producidas por *Candida parapsilosis sensu stricto*, así como propiciar un posible sesgo de selección, que limita la representatividad de la muestra (Fletcher R, Fletcher SW, 2016; Rothman et al., 2014; Silva et al., 2011). La elección en el presente trabajo de una muestra de conveniencia en estas dos etapas de validación, a pesar de ser una técnica de muestreo no probabilístico, viene determinada por la accesibilidad de los aislamientos empleados para la validación realizada. A pesar de las críticas más obvias acerca del muestreo por conveniencia (sesgos o falta de validez externa del estudio), debidas a que no garantizan la imparcialidad de la muestra al ser escogida, los estudios realizados durante este trabajo de Tesis Doctoral indican que el sesgo producido por la elección de la muestra es tendiente al nulo, si bien el escaso tamaño muestral durante la validación de la eficacia y efectividad de la técnica propuesta limitó la precisión de la estimación de los parámetros de validez interna de la misma (sensibilidad y especificidad).

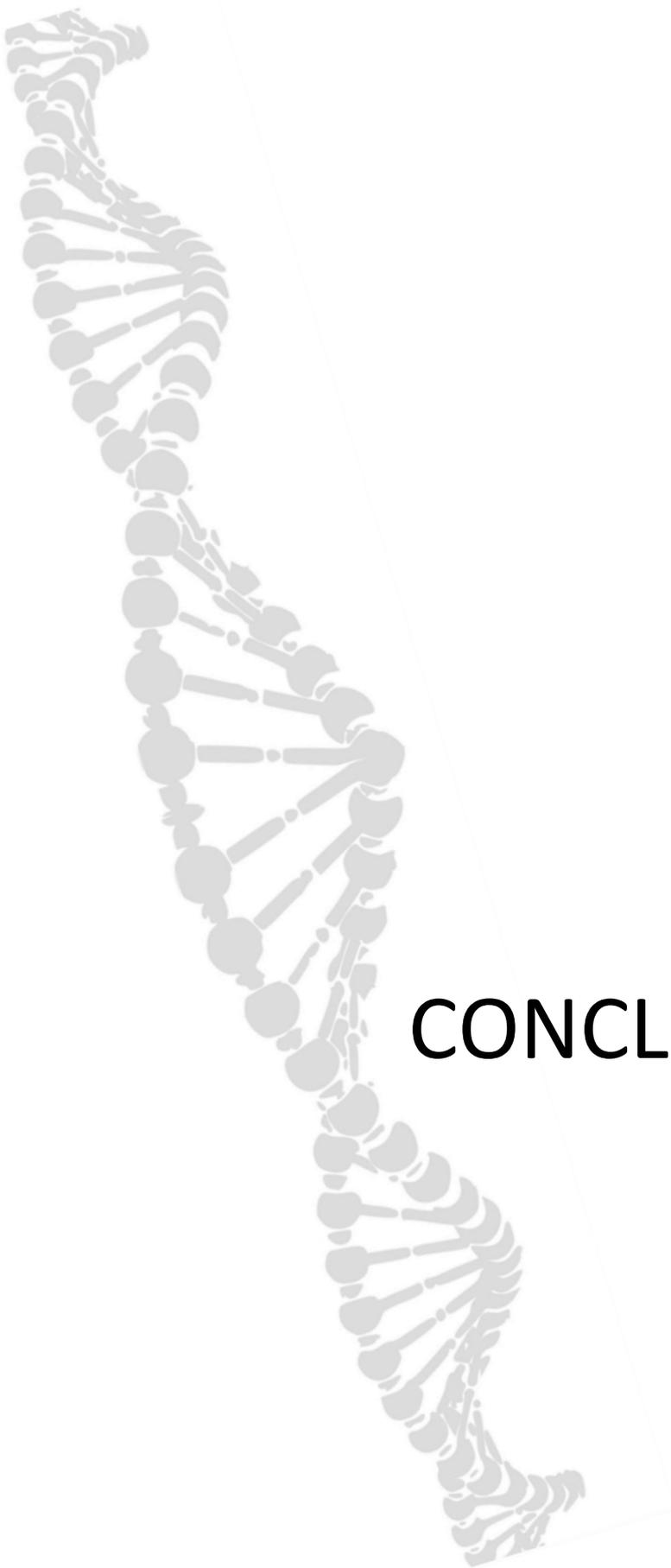
En referencia a la representatividad de la muestra, si consideramos la información contenida relativa a las especies de *Candida* reflejadas en el Atlas de Hongos de interés Clínico (de Hoog et al., 2014), de las 35 especies de *Candida* de interés clínico reflejadas, este estudio recoge 15 especies, lo que supone un 42,86% del total de especies reflejadas. Si a ello le añadimos la distribución epidemiológica de las candidemias en los centros hospitalarios, tenemos que las especies no incluidas podrían representar entre un 1 a 5% de total de los aislamientos implicados en las enfermedades invasoras causadas por *Candida* (Diekema et al., 2002; Horn et al., 2009; Leroy et al., 2009; Lyon et al., 2010; Messer et al., 2006; Nucci et al., 2010).

Estos datos sustentan la premisa anteriormente formulada de que el impacto de la elección de una muestra de conveniencia en este estudio para la validez externa es escaso, dado que las especies no incluidas en la validación de la eficacia son muy poco prevalentes. Respecto a los posibles sesgos de selección, la inclusión además de las muestras de aislamientos clínicos de CRC, las muestras de los aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* obtenidas durante la realización del estudio FUNGEMYCA, muestran que existen genotipos comunes o epidémicos, si bien la diversidad es mayor cuanto mayor es el número de aislamientos clínicos analizados. No obstante, la estimación de la concordancia entre la

técnica diseñada y la original descrita por Sabino y colaboradores (2010) fue idéntica, lo que nos permite aseverar que las estimaciones puntuales de los parámetros de validez interna no se ven afectadas, lo que indica de manera indirecta que el posible sesgo de selección tiende hacia el nulo. Sin embargo, el tamaño muestral empleado en la validación de la eficacia y efectividad si tiene impacto sobre la estimación por intervalo de confianza de los parámetros de sensibilidad y especificidad, índice kappa y valores predictivos. El aumento del tamaño muestral condicionaría un aumento de la precisión del intervalo disminuyendo el rango del mismo (Fletcher et al., 2016; Rothman et al., 2014). De hecho, si estimásemos tanto la sensibilidad como la especificidad teniendo en cuenta la globalidad de las especies de relevancia clínica contenida en el Atlas de Hongos de interés clínico (de Hoog et al., 2014) sería de 100% IC95% (0,342 , 1) y 100% IC95% (0,896, 1) respectivamente.

Finalmente, otro aspecto destacable en referencia a la evaluación de pruebas diagnósticas que describe el presente estudio es el impacto de la prevalencia de la enfermedad en la estimación de los valores predictivos positivos y negativos que tienen un gran valor en el diagnóstico clínico, debido a que representan la probabilidad de que un paciente cuyo resultado sea positivo (o negativo) padezca realmente la enfermedad (o no). Los valores predictivos están influidos predominantemente por la especificidad de la técnica empleada y la prevalencia de la enfermedad en la población (Fletcher et al., 2016; Rothman et al., 2014). Si se observan los resultados del presente trabajo de Tesis Doctoral, se puede observar que al ajustar en base a la prevalencia de candidemia reflejada por el estudio EPINE (Grupo de estudio EPINE, 2017), el valor predictivo positivo disminuye mientras que el valor predictivo negativo se ve afectado en menor cuantía. Este aspecto está poco reflejado en la evaluación de las pruebas diagnósticas aplicadas al diagnóstico micológico clínico, ya que generalmente se toma el valor de prevalencia de la especie en la muestra analizada que suele ser muy superior al obtenido en la práctica clínica real. Por lo tanto, los resultados de este trabajo, formulan un aspecto de mejora importante al incorporar el análisis de evaluación de pruebas de diagnóstico micológico en el futuro a corto plazo permitiéndonos estimar con mayor exactitud el impacto de la adopción de la mismas en el diagnóstico de nuestros futuros pacientes.

En resumen, la genotipificación de aislamientos clínicos de la especie *Candida parapsilosis sensu stricto* puede contribuir a la mejora del diagnóstico, tratamiento y manejo de las candidiasis invasivas causadas por esta especie. Además, se puede convertir en un futuro cercano en una herramienta imprescindible para entender la dinámica de su transmisión intrahospitalaria y en la comunidad, lo que ayudaría a establecer las medidas de control de infección adecuadas para disminuir la incidencia de las candidiasis, sobre todo en el ambiente hospitalario, y especialmente en aquellos pacientes con factores de riesgo asociados, como los neonatos.



CONCLUSIONES

6. Conclusiones

1. La técnica de PCR múltiple descrita para la genotipificación de *Candida parapsilosis sensu stricto* mediante el análisis de cuatro regiones con microsatélites es equivalente a la técnica de referencia descrita por Sabino y colaboradores.
2. La enzima *Taq* polimerasa AmpliTaq Gold® DNA polymerase permite obtener resultados óptimos sin que aparezcan productos de amplificación inespecíficos.
3. El esquema de amplificación tipo *touchdown* incrementa la amplificación correcta y específica de los cuatro *loci* estudiados, CP1, CP4, CP6 y B5, en una única reacción de PCR.
4. La validación interna del nuevo protocolo de PCR múltiple con cepas de referencia de *Candida* (condiciones ideales) mostró una eficacia similar al de Sabino y colaboradores.
5. La validación interna y externa del nuevo protocolo con aislamientos clínicos (en condiciones reales) constata que los criterios de definición de candidemia relacionada con el catéter son muy sensibles, pero moderadamente específicos.
6. La genotipificación con el presente protocolo de PCR múltiple de *Candida parapsilosis sensu stricto* permite establecer con certeza la relación filogenética entre aislamientos de sangre y de catéter de pacientes con candidemia relacionada con el catéter.
7. Este método de genotipificación junto con los datos clínicos y epidemiológicos, es una herramienta para la identificación de los posibles orígenes y mecanismos de transmisión en los brotes de candidiasis por *Candida parapsilosis sensu stricto*.
8. Nuestro método permite realizar estudios filogenéticos de detección de genotipos locales y epidémicos en distintas áreas geográficas o instituciones sanitarias.
9. La genotipificación con microsatélites combinada con datos fenotípicos de sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos o de producción de biopelículas, es útil para estudiar asociaciones epidemiológicas e identificar marcadores genéticos en las candidiasis por *Candida parapsilosis sensu stricto*.



BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- Aguado, J. M., Ruiz-Camps, I., Muñoz, P., Mensa, J., Almirante, B., Vázquez, L., Cuenca-Estrella, M. (2011). Guidelines for the treatment of Invasive Candidiasis and other yeasts. Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(5), 345–361.
- Almirante, B. (2013). Proyecto CandiPop. Estudio multicéntrico nacional sobre candidemia: presentación de estudios clínicos. In: IV Jornada científica del Grupo de estudio de Micología Médica de la SEIMC.
- Almirante, B., Rodríguez, D., Cuenca-Estrella, M., Almela, M., Sánchez, F., Ayats, J., Pahissa, A. (2006). Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: Case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1681–1685.
- Almirante, B., Rodríguez, D., Park, B. J., Cuenca-Estrella, M., Planes, A. M., Almela, M., Pahissa, A. (2005). Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: Results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1829–1835.
- Arendrup, M. C., Fursted, K., Gahrn-Hansen, B., Schønheyder, H. C., Knudsen, J. D., Jensen, I. M., ... Johansen, H. K. (2008). Semi-national surveillance of fungaemia in Denmark 2004–2006: Increasing incidence of fungaemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(5), 487–494.
- Arendrup, M. C., Park, S., Brown, S., Pfaller, M., & Perlin, D. S. (2011). Evaluation of CLSI M44-A2 disk diffusion and associated breakpoint testing of caspofungin and micafungin using a well-characterized panel of wild-type and fks hot spot mutant *Candida* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 1891–1895.
- Ashford B. (1928). Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 8, 507–538.
- Asmundsdóttir, L. R., Erlendsdóttir, H., Haraldsson, G., Guo, H., Xu, J., & Gottfredsson, M. (2008). Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. *Clinical Infectious Diseases*. *Infectious Diseases Society of America*, 47, e17–e24.

- Ayats, J., Martín-Mazuelos, E., Pemán, J., Quindós, G., Sánchez, F., García-Rodríguez, J., Cuenca-Estrella, M. (2011). Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) guidelines for the diagnosis of invasive fungal infections. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(1), 39.e1-15.
- Baillie, G. S., & Douglas, J. J. (1999). Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 48(7), 671–679.
- Barbedo, L. S., Vaz, C., Pais, C., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Muniz, M. de M., Zancoppe-Oliveira, R. M., & Sampaio, P. (2015). Different scenarios for *Candida parapsilosis* fungaemia reveal high numbers of mixed *C.parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* infections. *Journal of Medical Microbiology*, 64(1), 7–17.
- Barchiesi, F., Caggiano, G., Falconi Di Francesco, L., Montagna, M. T., Barbuti, S., & Scalise, G. (2004). Outbreak of fungemia due to *Candida parapsilosis* in a pediatric oncology unit. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 49(4), 269–271.
- Barron, A. E., & Blanch, H. W. (1995). DNA separations by slab gel and capillary electrophoresis: Theory and practice. *Separation & Purification Reviews*, 24(1), 1–118.
- Blanco-Blanco, M. T., Gómez-García, A. C., Hurtado, C., Galán-Ladero, M. A., Lozano, M. del C., García-Tapias, A., & Blanco, M. T. (2014). *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: Incidence, epidemiology and antifungal susceptibility. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(2), 145–148.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–331.
- Bouza E, Liñares J, Pascual, A. (2004). Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres intravasculares. En: *Procedimientos en Microbiología Clínica* (2ª edición). Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Retrieved from <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologiapdf>.
- Branchini, M. L., Pfaller, M. A., Rhine-Chalberg, J., Frempong, T., & Isenberg, H. D. (1994). Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(2), 452–456.
- Brillowska-Dabrowska, A., Schön, T., Pannanusorn, S., Lönnbro, N., Bernhoff, L., Bonnedal, J., Arendrup, M. C. (2009). A nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* in southern Sweden verified by genotyping. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 41(2), 135–142.

- Brun-Buisson, C., Abrouk, F., Legrand, P., Huet, Y., Larabi, S., & Rapin, M. (1987). Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. *Archives of Internal Medicine*, *147*(5), 873–7.
- Butler, J. M. (1998). The use of capillary electrophoresis in genotyping STR loci. In Lincoln PJ & Thomson J (Eds.), *Methods in molecular biology* (Vol. 98, pp. 279–89). Humana Press.
- Butler, J. M., Buel, E., Crivellente, F., & McCord, B. R. (2004). Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*, *25*(10–11), 1397–1412.
- Cantón, E., Pemán, J., Quindós, G., Eraso, E., Miranda-Zapico, I., Álvarez, M., Velasco, D. (2011). Prospective Multicenter Study of the Epidemiology, Molecular Identification, and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* Isolated from Patients with Candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(12), 5590–5596.
- Cassone, A., Bernardis, F. De, Pontieri, E., Carruba, G., Girmenia, C., Martino, P., Pontón, J. (1995). Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *Journal of Infectious Diseases*, *171*(4), 967–975.
- Castro, K. G., Ward, J. W., Slutsker, L., Buehler, J. W., Jaffe, H. W., Berkelman, R. L., & Curran, J. W. (1993). 1993 revised classification system for hiv infection and expanded surveillance case definition for aids among adolescents and adults. *Clinical Infectious Diseases*, *17*(4), 802–810.
- Centers for Disease Control (CDC)/National Healthcare Safety Network (NHSN). (2017). Bloodstream Infection Event (Central Line-Associated Bloodstream Infection and Non-central line-associated Bloodstream Infection). In: National Healthcare Safety Network (NHSN) Patient Safety Component Manual [Internet Document], (18 September). Available from: https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual_current.pdf.
- Chen, Y. C., Lin, Y. H., Chen, K. W., Lii, J., Teng, H. J., & Li, S. Y. (2010). Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *68*(3), 284–292.
- Chow, J. K., Golan, Y., Ruthazer, R., Karchmer, A. W., Carmeli, Y., Lichtenberg, D., Hadley, S. (2008). Factors associated with candidemia caused by non-*albicans* *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases. Infectious Diseases Society of America*, *46*(8), 1206–1213.

- Clark, T. A., Slavinski, S. A., Morgan, J., Lott, T., Arthington-Skaggs, B. A., Brandt, M. E., Hajjeh, R. A. (2004). Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4468–4472.
- Cleri, D. J., Corrado, M. L., & Seligman, S. J. (1980). Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. *The Journal of Infectious Diseases*, 141(6), 781–786.
- CLSI. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (Vol. 28).
- CLSI. (2012). Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. M27–S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 4th informational supplement. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 28, 1–35.
- Cohen, J. F., Korevaar, D. A., Altman, D. G., Bruns, D. E., Gatsonis, C. A., Hooft, L., Bossuyt, P. M. M. (2016). STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. *BMJ Open*, 6(11), e012799.
- Contreras, I., Pontón, J., & Quindós, G. (1994). Prevalence of *Candida parapsilosis* in the oral cavities of infants in Spain. *Clinical Infectious Diseases*, 18, 480–481.
- Covarrubias-Pazaran, G., Diaz-Garcia, L., Schlautman, B., Salazar, W., & Zalapa, J. (2016). Fragman: an R package for fragment analysis. *BMC Genetics*, 17(1), 62.
- Da Silva Ruiz, L., Montelli, A. C., Sugizaki, M. de F., Da Silva, E. G., De Batista, G. C. M., Moreira, D., & Paula, C. R. (2013). Outbreak of fungemia caused by *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: Molecular investigation through microsatellite analysis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(2), 112–115.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, F. M. (2014). Atlas of Clinical Fungi (fourth edition) [CD-ROM]. Utrecht (Países Bajos).
- Del Pozo, J. L., & Cantón, E. (2016). Candidiasis asociada a biopelículas. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(3), 176–183.
- Delfino, D., Scordino, F., Pernice, I., Lo Passo, C., Galbo, R., David, A., ... Romeo, O. (2014). Potential association of specific *Candida parapsilosis* genotypes, bloodstream infections and colonization of health workers' hands. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(11), O946–O951.
- Desmarais, D., Zhong, Y., Chakraborty, R., Perreault, C., & Busque, L. (1998). Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). *Journal of Forensic Sciences*, 43(5), 1046–1049.

- Diab-Elschahawi, M., Forstner, C., Hagen, F., Meis, J. F., Lassnig, A. M., Presterl, E., & Klaassen, C. H. W. (2012). Microsatellite genotyping clarified conspicuous accumulation of *Candida parapsilosis* at a cardiothoracic surgery intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(11), 3422–3426.
- Diekema, D. J., Messer, S. A., Brueggemann, A. B., Coffman, S. L., Doern, G. V., Herwaldt, L. A., & Pfaller, M. A. (2002). Epidemiology of candidemia: 3-Year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(4), 1298–1302.
- Dizbay, M., Kalkanci, A., Sezer, B. E., Aktas, F., Aydogan, S., Fidan, I., Sugita, T. (2008). Molecular investigation of a fungemia outbreak due to *Candida parapsilosis* in an intensive care unit. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *12*(5), 395–399.
- Dolník, V. (1999). DNA sequencing by capillary electrophoresis (review). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* *41*(2-3), 103-119.
- Edwards, M. C., & Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: Advantages, development, and applications. *Genome Research*, *3*(4), S65-75.
- Enger, L., Joly, S., Pujol, C., Simonson, P., Pfaller, M., & Soll, D. R. (2001). Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(2), 658–669.
- Eraso, E., Moragues, M. D., Villar-Vidal, M., Sahand, I. H., González-Gómez, N., Pontón, J., & Quindós, G. (2006). Evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(9), 3340–3345.
- Escribano, P., Guinea, J., Marcos-Zambrano, L. J., Martín-Rabadán, P., Fernández-Cruz, A., Sánchez-Carrillo, C., Bouza, E. (2014). Is catheter-related candidemia a polyclonal infection? *Medical Mycology* (Vol. 52, pp. 411–416).
- Feng, X., Ling, B., Yang, G., Yu, X., Ren, D., & Yao, Z. (2012). Prevalence and Distribution Profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* Responsible for Superficial Candidiasis in a Chinese University Hospital. *Mycopathologia*, *173*(4), 229–234.
- Ferrer, C., & Almirante, B. (2014). Infecciones relacionadas con el uso de los cateteres vasculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *32*(2), 115–124.
- Fletcher R, Fletcher SW, F. G. (2016). *Epidemiología clínica* (5ª edición). Barcelona: Wolters Kluwer Health.

- Forbes, S. H., Hogg, J. T., Buchanan, F. C., Crawford, A. M., & Allendorf, F. W. (1995). Microsatellite Evolution in Congeneric Mammals: Domestic and Bighorn Sheep. *Molecular Biology and Evolution*, *12*(6), 1106–1113.
- Garcia-Effron, G., Canton, E., Pemán, J., Dilger, A., Romá, E., & Perlin, D. S. (2012). Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish University Hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(11), 2739–2748.
- Garcia-Effron, G., Katiyar, S. K., Park, S., Edlind, T. D., & Perlin, D. S. (2008). A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(7), 2305–2312.
- Garcia-Hermoso, D., Desnos-Ollivier, M., & Bretagne, S. (2016). Typing *Candida* Species Using Microsatellite Length Polymorphism and Multilocus Sequence Typing. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1356, 199–214.
- García San Miguel, L., Pla, J., Cobo, J., Navarro, F., Sánchez-Sousa, A., Alvarez, M. E., Moreno, S. (2004). Morphotypic and genotypic characterization of sequential *Candida parapsilosis* isolates from an outbreak in a pediatric intensive care unit. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *49*(3), 189–196.
- Girard R, Perraut M, Prüss A, Savey A, Tikhomirov E, Thuriaux M, V. (2003). Prevención de las infecciones nosocomiales. In *Guía práctica* (2ª edición). Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Gomez-Lopez, A., Alastruey-Izquierdo, A., Rodriguez, D., Almirante, B., Pahissa, A., Rodriguez-Tudela, J. L., Gimenez, M. (2008). Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: Results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(4), 1506–1509.
- Grupo de estudio EPINE. (2017). ESTUDIO EPINE-EPPS 2016: Informe global de España. Resumen provisional. Retrieved from <http://hws.vhebron.net/epine/Global/EPINE-EPPS 2016 Informe Global de España Resumen.pdf>
- Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*, 5–10.
- Hajjeh, R. A., Sofair, A. N., Harrison, L. H., Lyon, G. M., Arthington-Skaggs, B. A., Mirza, S. A., Warnock, D. W. (2004). Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(4), 1519–1527.

- Hammoud, M. S., Al-Taiar, A., Fouad, M., Raina, A., & Khan, Z. (2013). Persistent candidemia in neonatal care units: risk factors and clinical significance. *International Society for Infectious Diseases*, 17(8), e624-8.
- Hermoso, C. G., Quintana, F. B., Vázquez, V. S., Lahoz, J. G., del Amo Valero, J., & Ruiz-Navarro, M. D. (2000). Efecto del tratamiento antirretrovírico y de la profilaxis para enfermedades oportunistas en la supervivencia de los pacientes con {SIDA}. *Revista Clínica Española*, 200(4), 187–192.
- Hernández-Castro, R., Arroyo-Escalante, S., Carrillo-Casas, E., Moncada-Barrón, D., Álvarez-Verona, E., Hernández-Delgado, L., Lavalle-Villalobos, A. (2010). Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: A health care workers source. *European Journal of Pediatrics*, 169(7), 783-787.
- Horn, D. L., Neofytos, D., Anaissie, E. J., Fishman, J. A., Steinbach, W. J., Olyaei, A. J., Webster, K. M. (2009). Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. *Clinical Infectious Diseases*, 48(12), 1695–1703.
- Hunter, P. R. (1990). Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(9), 1903–1905.
- Jack, L., Bal, A. M., Harte, S., & Collier, A. (2016). International guidelines: the need to standardize the management of *Candidaemia*. *Infectious Diseases*, 48(11–12), 779–781.
- Kao, A. S., Brandt, M. E., Pruitt, W. R., Conn, L. A., Perkins, B. A., Stephens, D. S., Hajjeh, R. A. (1999). The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clinical Infectious Diseases. Infectious Diseases Society of America*, 29(5), 1164–1170.
- Kim, S. K., El Bissati, K., & Mamoun, C. Ben. (2006). Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 152(10), 2885–2894.
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 13–15.
- Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2002). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity*, 70(2), 878–888.

- Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Clark, T. A., Pujol, C., Chandra, J., Hajjeh, R. A., ... Ghannoum, M. A. (2004). *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerging Infectious Diseases*, 10(6), 1074–1081.
- Kullberg, B. J., & Arendrup, M. C. (2015). Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 373(15), 1445–1456.
- Laffey, S. F., & Butler, G. (2005). Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 151(4), 1073–1081.
- Landis, J., & Koch, G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 33(1), 159–174.
- Lasker, B. A., Butler, G., & Lott, T. J. (2006). Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 750–759.
- Lattif, A. A., K. Mukherjee, P., Chandra, J., Swindell, K., Lockhart, S. R., Diekema, D. J., ... Ghannoum, M. A. (2010). Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(4), 265–270.
- Silva-Ayçaguer L. C. (2000). Diseño razonado de muestras y captación de datos para la investigación sanitaria. Madrid: Díaz de Santos.
- Lehmann, P. F., Lin, D., & Lasker, B. A. (1992). Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(12), 3249–3254.
- Leroy, O., Gangneux, J.-P., Montravers, P., Mira, J.-P., Gouin, F., Sollet, J.-P., ... Lortholary, O. (2009). Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). *Critical Care Medicine*, 37(5), 1612–1618.
- Lin, M. Y., Carmeli, Y., Zumsteg, J., Flores, E. L., Tolentino, J., Sreeramoju, P., & Weber, S. G. (2005). Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: A case-case-control study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), 4555–4560.
- Linares-Sicilia, M. J., & Solís-Cuesta, F. (2007). Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología*, (11), 1–20.
- Lockhart, S. R., Messer, S. A., Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2008). Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*, in comparison to the closely-related species *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2659–2664.

- Longtin, Y., Sax, H., Allegranzi, B., Schneider, F., & Pittet, D. (2011). Videos in clinical medicine. Hand hygiene. *The New England Journal of Medicine*, 364(13), e24.
- Luzzati, R., Merelli, M., Ansaldi, F., Rosin, C., Azzini, A., Cavinato, S., Bassetti, M. (2016). Nosocomial candidemia in patients admitted to medicine wards compared to other wards: a multicentre study. *Infection*, 44(6), 747–755.
- Lyon, G. M., Karatela, S., Sunay, S., & Adiri, Y. (2010). Antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from The *Candida* surveillance study. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1270–1275.
- Magobo, R. E., Naicker, S. D., Wadula, J., Nchabeleng, M., Coovadia, Y., Hoosen, A., Patel, J. (2017). Detection of neonatal unit clusters of *Candida parapsilosis* fungaemia by microsatellite genotyping: Results from laboratory-based sentinel surveillance, South Africa, 2009-2010. *Mycoses*, 60(5), 320–327.
- Maki, D. G., Weise, C. E., & Sarafin, H. W. (1977). A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *The New England Journal of Medicine*, 296(23), 1305–9.
- Marcos-Zambrano, L. J., udith, Escribano, P., Bouza, E., & Guinea, J. (2014). Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 1192–1198.
- Martí-Carrizosa, M., Sánchez-Reus, F., March, F., Cantón, E., & Coll, P. (2015). Implication of *Candida parapsilosis* FKS1 and FKS2 mutations in reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3570–3573.
- Messer, S. A., Jones, R. N., & Fritsche, T. R. (2006). International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1782–1787.
- Miranda-Zapico, I., Eraso, E., Hernández-Almaraz, J. L., López-Soria, L. M., Carrillo-Muñoz, A. J., Hernández-Molina, J. M., & Quindós, G. (2011). Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(10), 2315–2322.
- Miranda, L. D. N., Rodrigues, E. C. a., Costa, S. F., van der Heijden, I. M., Dantas, K. C., Lobo, R. D., Levin, a. S. (2012). *Candida parapsilosis* Candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. *BMJ Open*, 2(4), e000992–e000992.

- Mullis, K. B. (1991). The Polymerase Chain Reaction in an Anemic Mode : How to Avoid Cold Oligodeoxyribonuclear Fusion. *PCR Methods and Applications*, 1, 1–4.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155(155), 335–350.
- Murray PR, Rosenthal KS, P. M. (2009). Sección VII: Fármacos antifúngicos. In M. PR (Ed.), *En: Microbiología médica* (6ª edición, pp. 701–714). Barcelona: Elsevier.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*.
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 71–92.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobón, A. M., Restrepo, A., & Colombo, A. L. (2010). Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, 51(5), 561–570.
- O’Grady, N. P., Alexander, M., Burns, L. A., Dellinger, P., Garland, J., Heard, S. O., ... Saint, S. (2011). Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections , 2011 Oklahoma Foundation for Medical Quality. *Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)*, 39(4), 1–83.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., & Vieira, M. L. C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2), 294-307.
- Orberá Ratón, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología* 21, 15-19.
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Sobel, J. D. (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis. *Clinical Infectious Diseases* 62(4), e1-e50.
- Park SDE. (2001). Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. University of Dublin. Retrieved from <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepar k/ms-toolkit/>
- Pemán, J., Cantón, E., Linares-Sicilia, M. J., Roselló, E. M., Borrell, N., Ruiz-Pérez-de-Pipaon, M. T., García-García, I. (2011). Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: A Spanish multicenter prospective survey. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4158–4163.

- Pemán, J., Cantón, E., Miñana, J. J. C., Florez, J. A., Echeverría, J., Ortega, D. N., Nieto, A. G. (2011). Changes in the epidemiology of fungaemia and fluconazole susceptibility of blood isolates during the last 10 years in Spain: results from the FUNGEMYCA study. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(2), 91–9.
- Pemán, J., Cantón, E., Orero, A., Viudes, A., Frasquet, J., & Gobernado, M. (2002). Epidemiology of candidemia in Spain - Multicenter study. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19(1), 30–35.
- Pemán, J., & Salavert, M. (2013). Epidemiology and prevention of nosocomial invasive infections by filamentous fungi and yeasts. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 31(5), 328–41.
- Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: Prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, pii: S1473-3099(17)30316-X.
- Petti, C. a, & Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing. MM18_A. Clinical and Laboratory Standards Institute (Vol. 28).
- Pfaller, M. A. (2005). Antifungal Susceptibility Testing Methods. *Current Drug Targets*, 6(8), 929–943.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133–163.
- Pfaller MA, & Diekema DJ. (2012). The epidemiology of invasive candidiasis. In C. C. Calderone RA (Ed.), *Candida and Candidiasis* (second edition, pp. 449–480). Washington DC: American Society for Microbiology.
- Puig-Asensio, M., Padilla, B., Garnacho-Montero, J., Zaragoza, O., Aguado, J. M., Zaragoza, R., Almirante, B. (2013). Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), O245-54.
- Pujol, M., & Limón, E. (2013). Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(2), 108–113.
- Pulcrano, G., Roscetto, E., Iula, V. D., Panellis, D., Rossano, F., & Catania, M. R. (2012). MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(11), 2919–2928.

- Putman, A. I., & Carbone, I. (2014). Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecology and Evolution*, 4(22), 4399–4428.
- Quindós, G. (2014). Epidemiology of Candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(1), 42-48.
- Quindós G, Aguirre-Urizar JM, Ribacoba L, Olaechea-Astigarraga P, Eraso E, Z. R. (2015). Candidiasis. En G. Quindos (Ed.), *Micología médica* (1ª edición, pp. 87–107). Barcelona: Elsevier.
- Ramage, G., Martínez, J. P., & López-Ribot, J. L. (2006). *Candida* biofilms on implanted biomaterials: A clinically significant problem. In *FEMS Yeast Research* (Vol. 6, pp. 979–986).
- Reiss, E., Lasker, B. A., Lott, T. J., Bendel, C. M., Kaufman, D. A., Hazen, K. C., Lockhart, S. R. (2012). Genotyping of *Candida parapsilosis* from three neonatal intensive care units (NICUs) using a panel of five multilocus microsatellite markers: Broad genetic diversity and a cluster of related strains in one NICU. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1654–1660.
- Reyes-Valdés, M. (2013). Informativeness of microsatellite markers. In Kantartzi SK (Ed.), *In: Methods in Molecular Biology* (pp. 259–270). New York: Springer.
- Riboli, D. F. M., Lyra, J. C., Silva, E. P., Valadão, L. L., Bentlin, M. R., Corrente, J. E., Ribeiro de Souza da Cunha, M. de L. (2014). Diagnostic accuracy of semi-quantitative and quantitative culture techniques for the diagnosis of catheter-related infections in newborns and molecular typing of isolated microorganisms. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 283.
- Romeo, O., Delfino, D., Cascio, A., Lo Passo, C. Lo, Amorini, M., Romeo, D., & Pernice, I. (2013). Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. *Infection, Genetics and Evolution*, 13(1), 105–108.
- Rothman, K. J., Greenland, S., & Lash, T. (2014). *Modern Epidemiology, third edition*. Lippincott Williams and Wilkins (Vol. 44 Suppl 2).
- Roy, B., & Meyer, S. A. (1998). Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 216–218.

- Ruiz Gaitán, A. C., Moret, A., López Hontangas, J. L., Molina, J. M., Aleixandre López, A. I., Cabezas, A. H., ... Pemán, J. (2017). Nosocomial fungemia by *Candida auris*: First four reported cases in continental Europe. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(1), 23–27.
- Sabino, R., Sampaio, P., Rosado, L., Stevens, D. A., Clemons, K. V., & Pais, C. (2010). New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1677–1682.
- Sabino, R., Sampaio, P., Rosado, L., Videira, Z., Grenouillet, F., & Pais, C. (2015). Analysis of clinical and environmental *Candida parapsilosis* isolates by microsatellite genotyping—a tool for hospital infection surveillance. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(10), 954.e1–954.e8.
- Saiman, L., Ludington, E., Dawson, J. D., Patterson, J. E., Rangel-Frausto, S., Wiblin, R. T., National Epidemiology of Mycoses Study Group. (2001). Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 20(12), 1119–24.
- Santabárbara-Serrano J, & rubio-Aranda E, López-Antón RL, D. M.-E. P. (2016). Evaluación de las pruebas diagnósticas. En: *Manual de pruebas diagnósticas simples: evaluación y cálculo del tamaño muestral* (1ª edición, pp. 11–24). Zaragoza: Prensas de la Universidad de Zaragoza.
- Saxena, N., Maheshwari, D., Dadhich, D., & Singh, S. (2014). Evaluation of congo red agar for detection of biofilm production by various clinical *Candida* isolates. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 3(59), 13234–13238.
- Scherer, S., & Stevens, D. A. (1988). Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(4), 675–679.
- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6), 365–371.
- Sears D, S. B. (2017). *Candida auris*: An emerging multidrug-resistant pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*, 63, 95–98.
- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615–629.
- Shannon, C. E. (2001). A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review*, 5(1), 3–55.

- Shin, J. H., Park, M. R., Song, J. W., Shin, D. H., Jung, S. I., Cho, D., Ryang, D. W. (2004). Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 4025–4031.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2011). Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiology*, 19(5), 241-247.
- Song, J. W., Shin, J. H., Shin, D. H., Jung, S. I., Cho, D., Kee, S. J., Ryang, D. W. (2005). Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Medical Mycology*, 43(7), 657–661.
- Takezaki, N., Nei, M., & Tamura, K. (2014). POPTREEW: Web version of POPTREE for constructing population trees from allele frequency data and computing some other quantities. *Molecular Biology and Evolution*, 31(6), 1622–1624.
- Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A. R., Maiden, M. C. J., & Odds, F. C. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 284–292.
- Tavanti, A., Hensgens, L. A. M., Ghelardi, E., Campa, M., & Senesi, S. (2007). Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(5), 1455–1462.
- Tay, S. T., Na, S. L., & Chong, J. (2009). Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. *Journal of Medical Microbiology*, 58(2), 185–191.
- Tortorano, A. M., Prigitano, A., Lazzarini, C., Passera, M., Deiana, M. L., Cavinato, S., ... Montagna, M. T. (2013). A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. *Infection*, 41(3), 665-662.
- Treviño-Rangel, R. D. J., González-González, J. G., González, E. G., & González, G. M. (2012). *Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante. *Medicina Universitaria*, 14(56), 157–165.
- Trofa, D., Gácsér, A., & Nosanchuk, J. (2008). *Candida parapsilosis* , an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 606–625.
- Truant AL. (2002). Commercial methods for identification and susceptibility testing of fungi. *In: Manual of commercial methods in clinical microbiology* (pp. 225–248). Washington DC: American Society for Microbiology Press.

- Unahalekhaka, A. (2011). Epidemiología de las infecciones asociadas a la atención en salud. En N. W. Friedman C (Ed.), *Conceptos básicos de control de infecciones* (2ª edición, pp. 29–44). International Federation of Infection Control.
- Valentín, A., Cantón, E., Pemán, J., Fernandez-Rivero, M. E., Tormo-Mas, M. A., & Martínez, J. P. (2016). In vitro activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12), 3449–3452.
- van Asbeck, E. C., Clemons, K. V., & Stevens, D. A. (2009). *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(4), 283–309.
- van Asbeck, E. C., Huang, Y. C., Markham, A. N., Clemons, K. V., & Stevens, D. A. (2007). *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: Genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia*, 164(6), 287–293.
- van Asbeck, E., Clemons, K., Markham, A., & Stevens, D. (2008). Molecular epidemiology of the global and temporal diversity of *Candida parapsilosis*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 40(10), 827–834.
- van Pelt-Verkuil E, Clemons KV, S. DA. (2008). Variants and adaptations of the standard PCR protocol. In: *Principles and technical aspects of PCR amplification* (first edition, pp. 231–273). Springer Netherlands.
- Vaz, C., Sampaio, P., Clemons, K. V., Huang, Y. C., Stevens, D. A., & Pais, C. (2011). Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 71(2), 159–162.
- Vázquez-Lobo A, M.-G. A. (2014). Microsatélites. In R.-M. G. Cornejo-Romero A, Serrato-Díaz A, Rendon-Aguilar B (Ed.), *En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (1ª edición, pp. 75–100). Mexico: INECC-SEMARNAT.
- Wang H, Zhang L, Kudinha T, Kong F, Ma X-J, C. Y.-Z. et al. (2016). Investigation of an unrecognized large-scale outbreak of *Candida parapsilosis* sensu stricto fungaemia in a tertiary-care hospital in China. *Scientific Reports*, 6:27099.
- Weems, J. (1992). *Candida parapsilosis*: Epidemiology, Pathogenicity, Clinical Manifestations, and Antimicrobial Susceptibility. *Clinical Infectious Diseases*, 14(3), 756–766.

- White TJ, Innis MA, Gelfand DH, S. J. (1990). PCR protocols, a guide to methods and applications (pp. 315-322). New York: Academic Press.
- Wierdl, M., Dominska, M., & Petes, T. D. (1997). Microsatellite instability in yeast: Dependence on the length of the microsatellite. *Genetics*, *146*(3), 769–779.
- Ziccardi, M., Souza, L. O. P., Gandra, R. M., Galdino, A. C. M., Baptista, A. R. S., Nunes, A. P. F., Santos, A. L. S. (2015). *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. *International Journal of Medical Microbiology*, *305*(8), 848–859.



**MATERIAL
SUPPLEMENTARIO**

8. Material suplementario

8.1. Técnicas adicionales de análisis exploradas durante la estandarización

8.1.1. Análisis de Sustracción Espectral de Señal

Los primeros resultados obtenidos antes de la estandarización definitiva de la técnica, mostraron electroferogramas con diversos artefactos y que además tenían una relación señal/ruido (SNR) subóptima, lo que podrían ocasionar inexactitud a la hora de determinar el perfil filogenético de cada aislamiento y su genotipo. Por ello, se evaluó la fiabilidad del análisis de sustracción espectral de señal (SSSA: *Spectral Subtraction Signal Analysis*) con el objetivo de minimizar o soslayar los problemas derivados de la falta de especificidad de las enzimas empleadas (Takara y KAPA). Este sistema consiste en el análisis de una señal cualquiera en el dominio de la frecuencia permitiendo reducir y/o eliminar el ruido de fondo. La prueba de dicho análisis se evaluó sobre un conjunto de resultados de STR obtenidos a partir de las cepas de referencia de *Candida parapsilosis sensu stricto* empleadas a lo largo de todo el estudio (ATCC 22019 y ATCC MYA-4646 (CDC317)).

Una vez realizada la técnica de STR empleando la enzima KAPA2G Fast Multiplex PCR kit, y analizados los resultados usando el software PeakScanner software versión 1,0 (Applied Biosystems), los alelos obtenidos fueron diseñados por su tamaño en mer (pares de bases). El algoritmo de eliminación de ruido fue implementado mediante el uso de dos *softwares* diferentes: Matlab™ y Sig-View®. Los espectros correspondientes a las diferentes señales obtenidas tras el análisis por STR fue calculado usando la transformada rápida de Fourier (FFT), aplicando un filtro pasa banda (para disminuir el ruido presente y mejorar la relación señal/ruido) y reconstruyendo de nuevo la señal en el dominio tiempo empleando la inversa de la transformada rápida de Fourier (IFFT). El rendimiento del algoritmo fue evaluado calculando la relación señal/ruido antes y después del procesamiento.

8.1.2. Resultados

El primer análisis realizado con la enzima KAPA2G Fast Multiplex PCR kit mostró cuatro productos diferentes de PCR con longitudes que variaban entre los 150 y 330 pb. Sin embargo, el efecto de «tartamudeo» de la enzima fue notable, haciendo a veces difícil la designación alélica. Al aplicar el método SSSA, los resultados mostraron mejores perfiles de señales que hizo la designación alélica una tarea más fácil. La ratio de la señal de ruido varió de 8,1 a 12,3 dependiendo del tipo de ventana y su longitud. Los marcos promedio no mostraron el mejor rendimiento en la eliminación de ruido en los perfiles de los resultados. A pesar de estos resultados prometedores también se observó que el método SSSA tiende a destacar la amplitud y longitud de los picos reconstruidos que podría conducir a la determinación incorrecta del tamaño de los fragmentos. En la Figura 8.1 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos tras procesar los electroferogramas con el SSSA.

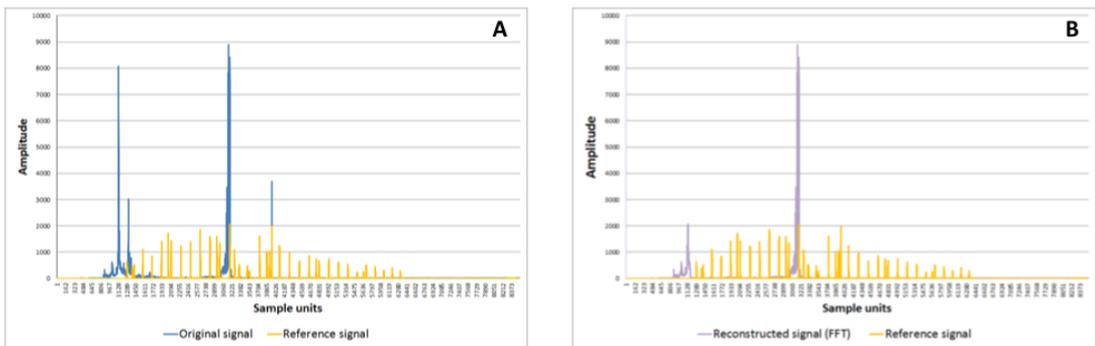


Figura 8.1. Ejemplo de electroferograma antes y después del procesado con SSSA; A: gráfico original, B: gráfico procesado con el SSSA.

Tabla 8.1. Identificación y genotipificación de los aislamientos clínicos del complejo *Candida parapsilosis* de hemocultivo y punta del catéter.

Paciente	Muestra	Especie identificada	Fragmentos microsatélites (pb)				Diagnóstico
			CP1	CP4	CP6	B5	
1	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	310/358	250/250	139/139	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	310/358	250/250	139/139	
2	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/281	133/139	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/281	133/139	
3	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	307/370	264/319	139/139	CRC
		<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	139/139	
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	139/139	
4	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	326/326	264/264	134/134	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	326/326	264/264	134/134	
5	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	362/370	267/270	120/134	NCRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	361/363	267/270	120/134	
6	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/270	351/370	290/293	133/137	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/270	352/370	290/293	133/137	
7	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	372/372	305/308	134/134	NCRC
		<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
	Catéter	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
8	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	307/307	258/258	152/152	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	307/307	258/258	152/152	
9	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/271	369/369	290/290	132/132	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/271	369/369	290/290	132/132	
10	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	360/363	267/270	119/134	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	361/364	267/270	119/134	
11	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/282	132/138	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/282	132/138	

12	Sangre	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
	Catéter	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
13	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	390/390	270/302	132/144	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	390/390	270/302	132/144	
14	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	216/222	372/372	305/308	134/134	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	216/222	372/372	305/308	134/134	
15	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	372/372	305/308	134/134	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	372/372	305/308	134/134	
16	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	216/222	372/372	305/308	134/134	NCRC
	Catéter	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
17	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	270/319	134/134	NCRC
	Catéter	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
18	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	320/320	134/134	CRC
	Catéter	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
19	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	320/320	125/134	
	Catéter	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
20	Sangre	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	NCRC
	Catéter	<i>C. tropicalis</i>	ND	ND	ND	ND	
21	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	372/372	285/305	134/134	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	372/372	285/305	134/134	
22	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	379/379	288/294	135/134	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	379/379	288/294	135/134	
23	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/384	273/320	134/134	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/384	273/320	134/134	
24	Sangre	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
	Catéter	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
24	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	323/343	253/253	163/163	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	324/343	253/253	163/163	

		<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/239	324/343	253/273	134/163	
25	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	354/354	273/273	110/110	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	354/354	273/273	110/110	
26	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	379/379	250/250	134/134	NCRC
		<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/282	132/132	
		<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
27	Sangre	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	NCRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	320/320	134/134	
		<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND	
28	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	351/351	273/308	110/110	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	351/351	273/308	110/110	
29	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	372/372	305/308	134/134	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	372/372	305/308	134/134	
30	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	320/320	134/134	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	320/320	134/134	
31	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	320/320	135/135	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/373	319/319	135/135	
32	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	276/319	135/135	NCRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	319/319	135/135	
33	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	400/420	270/302	133/145	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	400/420	270/302	133/145	
34	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	219/259	307/307	267/287	153/156	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	219/259	307/307	267/287	153/156	
35	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	270/320	135/135	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	270/319	135/135	
36	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	360/363	267/270	120/135	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	360/363	267/270	120/135	

37	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	139/139	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	139/139	
38	Sangre	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	360/363	267/270	120/135	CRC
	Catéter	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	360/363	267/270	120/135	

ND: No determinado; CRC: Candidemia relacionada a catéter; NCRC: No candidemia relacionada a catéter

8.2. Programación en el software R versión 3.1.0 para el análisis de la información contenida en las regiones analizadas para la tipificación molecular

#Defino los datos de frecuencia alélica para los distintos marcadores empleados

```
cp1 <- c(0.0303,0.0152,0.1970,0.0606,0.1818,0.4697,0.0152,0.0152,0.0152)
cp4 <-
c(0.1818,0.0152,0.0152,0.0303,0.0152,0.0455,0.0303,0.0152,0.0455,0.0152,0.0455,0
.1970,0.0606,0.1515,0.0606,0.0152,0.0303,0.0152,0.0152)
cp6 <-
c(0.0606,0.0303,0.0303,0.1212,0.0758,0.1212,0.0606,0.0152,0.0152,0.0152,0.0152,0
.0152,0.0455,0.0152,0.0152,0.0303,0.0758,0.0909,0.0152,0.0303,0.1061)
b5 <-
c(0.0606,0.0152,0.0455,0.0152,0.0606,0.0455,0.3788,0.1212,0.0152,0.0152,0.1061,0
.0152,0.0152,0.0303,0.0152,0.0152,0.0303)
```

#Contenido de información de los polimorfismos en CP1

#x es el vector de frecuencias alélicas para CP1

```
pic<-function(x){1-sum(x^2)-sum(x^2)^2+sum(x^4)}
```

#PIC máximo para los alelos obtenidos

```
mPIC<-function(a){(a-1)^2*(a+1)/a^3}
```

#Heterocigosidad

```
het<-function(x){1-sum(x^2)}
```

#Estimación no sesgada de la heterocigosidad

```
het.unbiased<-function(x,n){het(x)*n/(n-1)}
```

#Cálculo de la entropía (medida de la información)

```
MyLog2p<-function(x){if(x==0) 0 else x*log(x,2)} #Defining x logx
entropy<-function(x){-sum(sapply(x,MyLog2p))} #x is a vector of probabilities
```

#Cálculo de parámetros para CP1

```
PIC_CP1 <- pic(cp1)
mPIC_CP1 <- mPIC(cp1)
Indice_Simpson_CP1 <- het(cp1)
Est.Heterocigosidad_CP1 <- het.unbiased(cp1,1000)
Entropia <- entropy(cp1)
```

#Cálculo de parámetros para CP4

```
PIC_CP4 <- pic(cp4)
mPIC_CP4 <- mPIC(cp4)
Indice_Simpson_CP4 <- het(cp4)
Est.Heterocigosidad_CP4 <- het.unbiased(cp4,1000)
Entropia_CP4 <- entropy(cp4)
```

#Cálculo de parámetros para CP6

```
PIC_CP6 <- pic(cp6)
mPIC_CP6 <- mPIC(cp6)
Indice_Simpson_CP6 <- het(cp6)
Est.Heterocigosidad_CP6 <- het.unbiased(cp6,1000)
Entropia_CP6 <- entropy(cp6)
```

#Cálculo de parámetros para B5

```
PIC_B5 <- pic(b5)
mPIC_B5 <- mPIC(b5)
Indice_Simpson_B5 <- het(b5)
```

```

Est.Heterocigosidad_B5 <- het.unbiased(b5,1000)
Entropia_B5 <- entropy(b5)
resultado <- matrix(0,5,4)
resultado[1,1] <- PIC_CP1
resultado[1,2] <- PIC_CP4
resultado[1,3] <- PIC_CP6
resultado[1,4] <- PIC_B5
resultado[2,1] <- mPIC_CP1
resultado[2,2] <- mPIC_CP4
resultado[2,3] <- mPIC_CP6
resultado[2,4] <- mPIC_B5
resultado[3,1] <- Indice_Simpson_CP1
resultado[3,2] <- Indice_Simpson_CP4
resultado[3,3] <- Indice_Simpson_CP6
resultado[3,4] <- Indice_Simpson_B5
resultado[4,1] <- Est.Heterocigosidad_CP1
resultado[4,2] <- Est.Heterocigosidad_CP4
resultado[4,3] <- Est.Heterocigosidad_CP6
resultado[4,4] <- Est.Heterocigosidad_B5
resultado[5,1] <- Entropia_CP1
resultado[5,2] <- Entropia_CP4
resultado[5,3] <- Entropia_CP6
resultado[5,4] <- Entropia_B5
colnames(resultado) <- c("CP1","CP4","CP6","B5")
rownames(resultado) <- c("PIC","Maximun PIC","Gini-Simpson Index","Unbiased
estimation of heterozygosity","Entropy")
resultado

```

	CP1	CP4	CP6	B5
PIC	0.6644927	0.8774352	0.9197278	0.8022843
Maximum PIC	0.0000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
Gini-Simpson Index	0.7020071	0.8870294	0.9246742	0.8153942
Unbiased estimation of heterozygosity	0.7027098	0.8879174	0.9255998	0.8162104
Entropy	0.0000000	3.6130417	3.9989405	3.1789093

Tabla 8.2. Identificación y genotipificación de los aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis sensu stricto* obtenidos del estudio FUNGEMYCA.

ID_FUNGEMYCA	Especie identificada	Fragmentos STR (pb)			
		CP1	CP4	CP6	B5
AX 01	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	308/410	258/270	151/153
AX 05	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	376/388	269/269	134/134
AX 12	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/239	307/307	258/258	151/153
AX 13	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	391/391	293/293	135/135
AX 15	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	270/270	135/135
AX 16	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
AX 25	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	269/319	135/135
AX 26	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	282/305/370	270/290	11/135/161
AX 28	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	372/376	305/308	134/134
AX 30	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	323/323	253/267	151/151
AX 32	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/272	138/138
BS 02	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/410	270/270	135/135
BS 10	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/282	132/138
BH 08	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	372/375	304/345	135/135
BH 15	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	400/448	270/302	133/145
BH 28	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	319/319	134/134
BH 29	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	270/320	135/135
BH 41	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/372	269/304	135/135
BH 46	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	336/360	267/272	120/135
BH 49	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	219/222	307/326	258/258	151/153
CA 01	<i>C. metapsilosis</i>	MD	ND	ND	ND

CA 04	<i>C. metapsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
CA 06	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/373	305/305	134/134
CA 12	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	349/379	313/313	135/135
CA 14	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
CB 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
CB 07	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	349/399	270/302	128/132
CB 26	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	379/433	292/313	135/135
CB 27	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	281/281	138/138
CB 43	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/259	369/369	287/287	121/133
CB 55	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/245	370/370	316/319	134/134
CC 01	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	307/307	258/258	153/153
CC 07	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	307/307	258/258	153/153
CC 14	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/248	373/396	287/334	132/132
CC 15	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	323/323	253/253	151/151
CC 26	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	319/319	134/134
CD 03	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	352/352	289/289	110/110
CD 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/239	378/378	290/319	134/136
CD 18	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/239/242	371/374	310/313	133/134
CD 23	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/323	264/264	138/138
CH 06	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	269/319	135/135
CH 09-1	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	284/316	134/134
CH 12	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
CH 17	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/372/396	269/304	135/135
CH 18	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	230/230	348/351	272/272	112/112
CH 20	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	361/364	267/270	120/134
CH 22	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	379/379	253/293	134/134

CH 25	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/245	376/376	270/270	135/135
CH 27	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	372/372	304/304	134/136
CH 29	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	366/366	281/298	136/136
CH 32	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	219/259	306/306	266/287	155/155
CP 03	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/256	373/373	305/305	135/135
CP 08	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/239	307/307	258/258	153/153
CP 10	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/248	370/387	305/308	133/133
CP 11	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	294/307	267/267	133/134
CP410	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/373	305/305	135/135
CP413	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	320/320	135/135
CR 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/310	264/281	132/138
CR 05	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
CR 10	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	369/369	269/272	110/110
CR 12	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	323/339	253/267	153/153
CR 13	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
CS 02	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/245	369/369	269/269	135/151
CS 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	355/376	305/305	134/134
CS 07	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	360/363	266/269	120/135
CS 09	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	361/363	267/270	120/135
CS 10	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
CS 12	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/244	370/373	284/301	135/135
CS 22	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/376	305/305	134/134
CS 24	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	354/357	272/272	111/111
CS 25	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/239	307/370	264/292	133/135
CS 28	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	394/410	320/320	132/132

CS 42	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/239	379/379	307/313	135/136
CS 43	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	436/436	284/301	143/145
CS 44	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/261	369/369	287/311	132/134
CS 45	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	351/351	290/295	110/110
CS 46	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	391/420	287/293	132/134
CS 47	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
CS 57	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/373	304/316	135/135
CS 59	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/373	304/304	136/136
CS 64	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	361/397	267/270	119/134
CS 67	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
CS 72	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	355/355	273/273	110/110
CV 03	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	361/361	267/270	119/134
CV 09	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	355/355	272/272	110/110
CV 10	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	355/355	273/273	110/110
CV 12	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	270/270	125/134
CV 13	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/270	370/370	290/290	133/137
CV 16	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	291/410	284/301	133/133
CV 17	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
CV 22	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	310/310	264/281	103/138
CZ 01	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
CZ 15	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	319/319	134/134
CZ 16	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	118/138
CZ 18	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/281	138/138
DN 03	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	259/259	307/320	267/287	155/155
DN 08	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	230/265	352/355	270/273	135/136
DN 09	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/391	269/319	135/135

DN 13	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/392	304/307	134/136
DN 19	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	269/305	134/134
DN 23	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	397/397	269/319	135/135
DN 25	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
DP 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	369/369	284/304	133/134
DN 08-2	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	319/319	135/135
DP 09	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/239	307/307	278/278	151/153
DP 11	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
DP 16	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	269/319	135/135
DP 22	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
DP 23	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	269/318	135/135
DP 26	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	397/397	282/305	132/145
GC 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	323/323	259/259	153/153
GC 07	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
GC 19	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	219/230	352/352	273/296	134/134
GE 02	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
GE 10	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	370/373	270/320	133/133
GM 01	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	248/248	394/397	319/319	132/132
GM 02	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	136/138
GM 03	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
GM 15	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/291	133/138
GM 18	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/265	370/370	287/305	133/1333
GM 25	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	136/138
GM 28	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	336/370	255/272	110/110
GM 35	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/317	264/264	138/138

GM 36	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/239	307/307	239/258	151/153
GM 37	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/373	305/305	134/134
GM 39	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	270/319	134/134
GM 45	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	363/363	267/269	120/134
GM 50	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	136/138
GM 54	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	400/400	319/319	135/135
GM 72	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
GV 03	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	269/269	135/135
GV 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	354/354	273/273	110/110
GV 08	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	307/307	258/258	153/153
GV 11	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/245	307/307	281/281	138/138
GV 12	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	310/310	293/293	115/116
GV 17	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	307/310	261/293	115/153
GV 22	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	307/307	239/258	151/153
GV 28	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	219/259	307/307	266/266	155/157
JC 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/385	269/316	135/135
JC 07	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	338/338	290/290	116/116
JC 10	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/239	366/369	269/319	135/135
JC 11	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	366/370	269/322	135/136
JC 15	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	319/319	135/135
JC 16	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	394/394	301/301	133/133
JC 25	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	269/319	135/135
LE 03	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/265	373/385	302/302	132/132
LE 07	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	351/351	272/272	
MS 01	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	323/354	272/272	151/151
MS 03	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	323/355	272/272	151/151

MS 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/373	293/304	135/155
MS 19	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/253	348/355	272/272	149/151
PH 05	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	354/354	272/272	110/110
PH 07	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	407/407	269/319	135/135
PH 08	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	355/355	272/272	110/110
PH 13	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	381/381	269/319	135/135
PH 14	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	307/307	264/281	133/138
PH 16	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/281	133/138
PH 17	<i>C. metapsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
PH 19	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	307/307	264/281	133/138
PH 22-1	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	396/399	270/302	134/145
PH 22-2	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	396/400	302/302	135/145
PM 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/394	269/337	135/135
PM 25	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	307/370	264/267	135/135
PM 29	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
PM 30	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
PR 09	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	228/236	352/352	293/293	133/133
PR 10	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
PZ 05	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	394/394	319/319	133/133
PZ 07	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	394/410	319/319	133/133
PZ 09	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	308/308	284/295	138/138
PZ 14	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	375/399	304/304	135/138
PZ 20	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	394/410	319/319	133/133
PZ 24	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	370/370	287/311	133/133
PZ 25	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	307/307	264/287	133/138

PZ 33	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/259	373/373	287/287	133/134
PZ 39	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	385/385	269/319	135/135
PZ 42	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	385/385	270/319	135/135
PZ 43	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	351/370	272/272	110/110
PZ 49	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	270/319	134/134
PZ 51	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	269/319	135/135
PZ 52	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	319/319	134/134
PZ 53	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	269/319	135/135
RC 03	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/284	133/138
RC 06	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
RC 07	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	269/319	135/135
RC 11	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/247	369/369	293/304	133/135
RC 16	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/264	351/351	304/313	134/134
RC 17	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	373/373	305/305	134/134
RC 18	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/243	306/306	264/264	138/138
RC 19	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	269/319	135/135
RC 28	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/295	138/140
RC 32	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	394/433	284/319	133/133
RC 37	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	400/400	269/301	133/145
RC 44	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	372/372	319/322	135/135
RS 01	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
RS 02	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/239	307/307	264/281	138/140
RS 06	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
RS 07	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	307/307	364/295	138/140
RS 09	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	323/323	253/267	151/169
RS 10	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	269/290	134/147

RS 13	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	269/269	136/159
RS16	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/245	323/370	263/267	131/135
RS 16-A	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	323/323	253/267	151/169
RS 16-B	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
RS 23	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	372/372	319/322	135/135
RS 27	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	376/376	281/284	136/136
RS 28	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/253	307/375	281/284	136/136
RS 30	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	354/354	272/272	110/110
RS 33	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
RS 34	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	287/287	134/134
RS 35	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	360/363	267/269	120/135
RS 36	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	270/270	134/134
RS38	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	323/370	253/284	134/151
RS 41	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	307/307	279/293	115/115
RS 45	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	379/379	249/249	135/135
RS 46	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/373	305/305	134/134
RS 54	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/388	269/319	135/135
SA 01	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
SA 05	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/376	304/304	135/136
SA 06	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/248	370/370	293/296	132/132
SA 07	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	379/379	287/313	135/135
SA 09	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/373	304/314	135/135
SA 12	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	245/262	394/394	319/319	132/132
SA 15	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	397/397	301/301	135/145
SA 23	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	270/319	134/134

SA 25	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/247	307/307	235/241	136/136
SA 27	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
SA 28	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
SA 29	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	355/370	270/319	134/166
SA 30	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	230/230	351/351	272/272	110/110
SA 32	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	319/319	135/135
SB10	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/281	133/138
SD 05	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/236	307/307	264/264	138/138
SD 10	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/250	354/370	255/255	133/134
SD 17	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	323/323	253/253	151/151
SD 18	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/236	307/307	264/264	138/138
SD 21	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	307/307	276/290	151/151
SD 22	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/250	354/354	255/255	133/133
SD 26	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
SD 29	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
SD 32	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
SD 38	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	238/242	400/400	270/302	133/145
SD 39	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	400/400	270/301	133/145
	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
SD 41	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	354/354	272/272	151/151
SD 44	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	351/351	272/292	111/111
ST 02	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	323/323	253/270	151/153
ST 03	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	269/322	135/135
ST 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	319/319	134/134
ST 06	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	225/242	370/391	269/269	134/134
ST 07	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	394/394	319/319	133/133

ST 08	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
ST 09	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	304/304	134/134
ST 11	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	244/247	384/384	284/284	135/135
ST 12	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	244/247	384/384	284/284	135/135
ST 14	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	323/323	218/252	151/151
ST 20	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
ST 21	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
ST 27	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	269/319	135/135
ST 30	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	400/400	270/302	132/145
ST 36	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/373	304/304	134/134
ST 38	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/245	370/370	284/302	130/134
ST 39	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	369/369	269/269	135/135
ST 51	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	400/400	270/302	132/145
ST 53	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	379/379	292/292	134/134
ST 57	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	337/337	134/134
ST 59	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	367/419	273/273	126/126
ST 60	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	378/381	313/313	135/135
UN 02	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	385/387	270/319	134/134
UN 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	366/369	269/319	135/136
UN 05	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/239	307/307	264/301	133/138
UN 08	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	336/370	319/319	134/134
VD 02	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/239	410/410	290/290	135/135
VD 17	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/245	307/307	264/264	138/38
VL 01	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	219/259	307/307	267/287	153/155
VL 03	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND

VM 01	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	369/381	270/319	151/151
VM 08	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	369/382	270/319	151/151
VM 14	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	371/371	270/270	135/135
VM 15	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	136/138
VM 17	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
VM 18	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	351/366	290/290	110/110
VM 20	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	379/379	249/316	135/135
VM 27	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
VN 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
VN 10	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
VN 12	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
VN 17	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/267	138/153
VN 18	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	259/270	372/372	237/290	133/136
VN 20	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/239	352/355	273/293	110/110
VN 25	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	337/337	135/135
VR 05	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	230/259	307/307	229/229	157/157
VR 07	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	307/394	319/319	133/133
VR 09	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	352/352	273/293	110/110
VR 11	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/256	379/394	313/313	135/149
VR 12	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
VR 14	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	346/346	287/317	135/135
VR 19	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	370/370	273/302	133/145
VR 21	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
VR 22	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	373/373	323/323	137/137
VR 24	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	358/358	273/302	145/145
VR 28	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	208/139	311/311	282/282	135/139

VR 29	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/281	138/138
VR 31	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/330	264/264	139/139
VR 34	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/239	379/379	290/322	135/135
VR 35	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	219/259	307/307	287/289	153/155
VR 36	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
VR 38	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	219/259	307/307	267/267	155/155
VR 44	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
VR 48	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	342/342	273/273	151/151
VR 49	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	138/138
VR 50	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	320/320	135/135
VR 52	<i>C. orthopsilosis</i>	ND	ND	ND	ND
VR 53	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/264	121/139
VR 58	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	303/307	264/264	138/138
XC 01	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/242	427/436	284/301	133/133
XC 08	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/242	307/307	264/281	138/138
XC 09	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	270/320	135/135
XC 10	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>				
XC 11	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	239/245	397/414	247/247	147/147
ZA 02	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	236/242	307/307	264/278	133/138
ZA 03	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/244	370/370	301/307	133/133
ZA 04	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	242/245	370/370	302/308	133/133
ZA 05	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	222/242	370/370	270/320	135/135

ND: No determinado