

Candida y candidiasis invasora: estudio de la actividad antifúngica *in vitro* de arasertaconazol frente a cepas clínicas de *Candida* y caracterización molecular de cepas productoras de candidemia relacionada con el catéter

Laura Marcos-Zambrano^{1,2*}, Pilar Escribano¹, Sandra Recio¹, Jesús Guinea¹

1 Servicio de Microbiología, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, España; **2** Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

Resumen

La infección por *Candida* es un problema de salud pública que abarca desde alteraciones de la flora normal hasta infecciones sistémicas graves en pacientes inmunosuprimidos o portadores de catéteres intravasculares. El tratamiento de la candidiasis sistémica se basa en la administración de un tratamiento antifúngico correcto junto con la retirada del catéter intravascular, si se demuestra que éste es el origen de la infección. El aumento de cepas portadoras de resistencia antifúngica hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos para tratar la candidiasis; uno de los fármacos más novedosos es el arasertaconazol nitrato. En este proyecto se estudió la actividad antifúngica de arasertaconazol frente a aislados clínicos de *Candida*, así como el establecimiento de rangos de CMI aceptables con cepas de colección ATCC según los estándares establecidos en el documento CLSI M27-A3. Por otra parte, para estudiar si el catéter era el origen de la candidemia, se estudió la presencia de genotipos idénticos en muestras de sangre y catéter aislados simultáneamente en pacientes con candidemia y portadores de catéter intravascular. El otro objetivo del proyecto fue recoger prospectivamente y genotipar mediante el análisis de microsatélites las cepas mencionadas pertenecientes a las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

Palabras clave: candidiasis invasora, arasertaconazol, genotipado, microsatélites, short tandem repeats.

Cita: Marcos-Zambrano L, Escribano P, Recio S, Guinea J (2013) *Candida* y candidiasis invasora: estudio de la actividad antifúngica *in vitro* de arasertaconazol frente a cepas clínicas de *Candida* y caracterización molecular de cepas productoras de candidemia relacionada con el catéter. *Dianas* 2(1): e20130301. ISSN 1886-8746 dianas.20130301 URI

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 6 de julio, 2012

Copyright: © 2013 Marcos-Zambrano et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES

***E-mail:** lauraj.marcos@gmail.com



Introducción

La candidiasis invasora como problema clínico. Las infecciones por *Candida* son un problema de salud pública, que abarcan desde alteraciones en la flora normal hasta infecciones sistémicas graves en pacientes inmunodeprimidos. *Candida* es parte de la flora normal del tracto gastrointestinal pero es un patógeno oportunista capaz de causar infecciones que comprometen la vida de los pacientes infectados [1].

Candida spp. es capaz de causar diferentes manifestaciones clínicas que van desde infecciones superficiales leves que afectan la piel, uñas y mucosas orofaríngea y vaginal, o las manifestaciones más graves o candidiasis invasora en la que se afectan órganos profundos, la mucosa gastrointestinal o el torrente sanguíneo [1].

La candidiasis sistémica se observa fundamentalmente en pacientes con enfermedades debilitantes, neoplásicas, inmunosupresoras y en receptores de órgano sólido. Se trata de una infección muy grave con una mortalidad asociada que puede llegar al 40% [1, 2]. El tratamiento de la candidiasis invasora se basa en dos principios, uno es la instauración de un tratamiento antifúngico correcto y temprano. El segundo es la retirada del catéter si se demuestra que éste es el origen de la infección.

Fármacos para el tratamiento de las micosis. Determinación de la sensibilidad antifúngica. Los fármacos disponibles para el tratamiento de la candidiasis invasora se agrupan en las siguientes familias, cuyos representantes se muestran entre paréntesis: polienos (anfotericina B, nistatina); azoles (fluconazol, posaconazol, voriconazol e itraconazol); equinocandinas (casposfungina, micafungina y anidulafungina),

análogos de pirimidina (5-fluocitosina), alilaminas (terbinafina), tiocarbamatos (tolnaftato) y morfolinis [2, 3].

Los antifúngicos azólicos o azoles, son un grupo de fármacos ampliamente usados en el tratamiento de la candidiasis. Actúan inhibiendo la enzima 14- α -lanosterol demetilasa al interactuar con el citocromo P-450 del hongo. El bloqueo de esta enzima impide la conversión de lanosterol en ergosterol, componente fundamental de la membrana citoplasmática del hongo, produciéndose una alteración de la permeabilidad de la membrana y la acumulación de peróxidos tóxicos [4].

Desafortunadamente, el uso de azoles ha ocasionado el desarrollo de resistencia en diversas especies de *Candida*, fundamentalmente tras la selección de aislados de cepas con resistencia intrínseca (*Candida krusei*) o con capacidad de desarrollar resistencia secundaria (*Candida glabrata*) [1].

Para determinar la sensibilidad antifúngica de los aislados de *Candida*, el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) han desarrollado métodos de referencia basados en dilución en caldo [5, 6]. Ambos métodos se basan en observar la capacidad del antifúngico de inhibir el crecimiento de la levadura a diferentes concentraciones. Se determina el parámetro denominado concentración mínima inhibitoria (CMI), que se define como la menor concentración de antifúngico que produce una reducción visible en el crecimiento del microorganismo (aproximadamente del 50%). Ambos documentos han desarrollado puntos de corte para clasificar a los aislados como sensibles o resistentes ante las CMIs observadas de los antifúngicos usados en clínica, tal y como se muestra en la tabla 1 [6].

Antifúngico	Susceptible (S)	Susceptible dependiente de dosis (S-DD)	Intermedio (I)	Resistente (R)	No susceptible (NS)
Anidulafungina	≤ 2	-	-	-	> 2
Caspofungina	≤ 2	-	-	-	> 2
Fluconazol	≤ 8	16-32	-	≥ 64	-
Flucistosina	≤ 4	-	8-16	≥ 32	-
Itraconazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5	-	≥ 1	-
Micafungina	≤ 2	-	-	-	> 2
Voriconazol	≤ 1	2	-	≥ 4	-

Tabla 1: Puntos de corte para la interpretación de la CMI (en $\mu\text{g/ml}$) de los diferentes antifúngicos frente a aislados de *Candida* spp. [6]

Una parte fundamental para el desarrollo de estos documentos es la inclusión de cepas ATCC como controles de calidad que permiten verificar la correcta aplicación de la metodología propuesta. Estos controles permiten conocer la precisión y exactitud del test de susceptibilidad y es necesario conocer la variabilidad aceptable entre los resultados estudiando el comportamiento de estas cepas ATCC seleccionadas por su estabilidad genética. [6].

El problema de la resistencia a antifúngicos y la eficacia clínica de los fármacos disponibles hace necesario el desarrollo de nuevas moléculas que ayuden a paliar estas limitaciones. Los azoles son fármacos atractivos por tener una buena actividad antifúngica *in vitro*, y por poseer buenas características farmacocinéticas.

Arasertaconazol nitrato es un nuevo azol en evaluación; se trata del isómero R del sartaconazol, un imidazol cuyo uso está indicado en la Unión Europea para el tratamiento de micosis superficiales cutáneas como dermatofitosis, la candidiasis cutánea, pitiriasis versicolor y dermatitis seborreica del cuero cabelludo, así como la tinea pedis en Estados Unidos.

Se desconoce cuál es la actividad antifúngica de este fármaco frente a cepas clínicas de *Candida*, así como los rangos de CMI aceptables al estudiar cepas de colección ATCC según lo indicado en el documento del CLSI M27-A3, por lo que en el siguiente trabajo se pretenden evaluar estos aspectos.

El problema del catéter como origen de la candidemia. Tipificación molecular de cepas clínicas aisladas de sangre y catéter. La otra parte importante del manejo de la candidiasis invasora en la retirada del catéter cuando se sospecha que éste es el origen de la infección. Existen diferentes procedimientos

para determinar si el catéter es o no el origen de la candidemia; sin embargo, la única manera de probarlo es demostrar la presencia de la levadura aislada en sangre también en la punta del catéter.

De acuerdo con las últimas guías de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) para el tratamiento de las infecciones relacionadas con el catéter intravascular, el diagnóstico definitivo de la candidemia relacionada con el catéter (CRC) requiere el aislamiento e identificación de la misma especie tanto en el cultivo de la punta del catéter como en el cultivo de sangre [7]. Sin embargo, estos hallazgos pueden ser insuficientes para definir CRC en pacientes en los que se encuentren distintos genotipos en los cultivos de la punta del catéter o de la sangre, a pesar de que ambos hayan sido identificados como la misma especie.

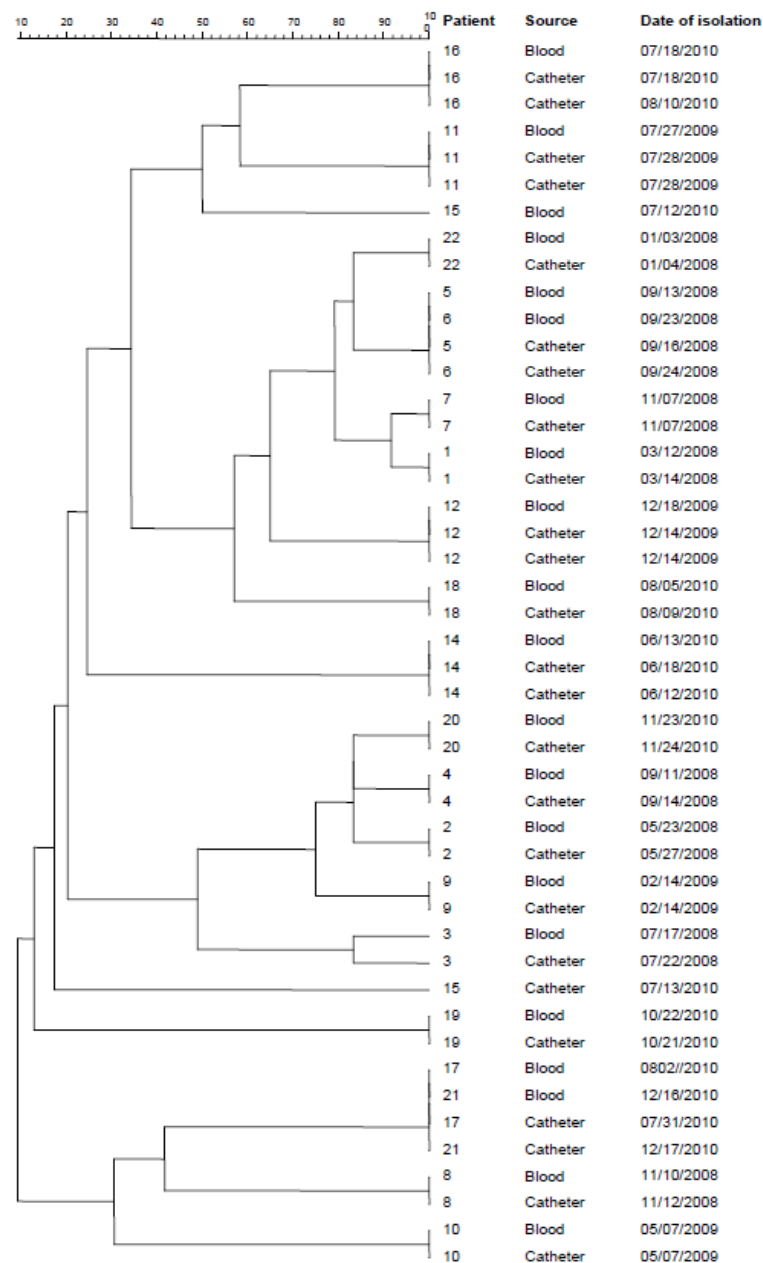


Figura 1: Dendrograma de similitud mostrando la relación genética entre los aislados estudiados. Los pacientes están enumerados del 1 al 21 (1 paciente fue excluido ya que presentaba genotipos mixtos en las muestras), se puede observar la procedencia clínica del aislado y la fecha del mismo.

C. albicans y *C. parapsilosis* son las especies más frecuentemente causantes de candidemia y de CRC. Se han desarrollado números métodos de tipado molecular para estas dos especies de *Candida*, entre los que destacan los microsatélites o *Short tandem repeats* (STR); este procedimiento consiste en la amplificación de genes formados por motivos repetidos en tándem de mono a hexa-nucleotidos presentes a lo largo del genoma [8-12]. Tras la amplificación, estos fragmentos son sometidos a electroforesis capilar para determinar su tamaño. En levaduras, los diferentes loci de microsatélites tienen variaciones de tamaño y esta variación polimórfica permite discriminar entre individuos pertenecientes a la misma especie. Dos cepas se definen como idénticas cuando se observa la misma composición alélica para todos los loci

estudiados, diferentes cuando se presentan diferencias en varios loci, o cepas clonalmente relacionadas cuando se constatan eventos microevolutivos si se observan cambios menores en un solo locus.

En un estudio previo del grupo de investigación, se analizaron retrospectivamente cepas de *Candida albicans* aisladas simultáneamente en la punta del catéter y en hemocultivos de 22 pacientes con CRC [13]. Las cepas aisladas fueron genotipadas usando un panel de 6 microsateles descritos anteriormente [8-12]. Se consideraron las cepas como idénticas cuando los 6 marcadores eran idénticos.

De los pacientes analizados, uno presentó presencia de varios genotipos en ambas muestras por lo que se excluyó del estudio. Un 90% de los pacientes analizados (19/21) presentaron un genotipo idéntico tanto en el catéter como el hemocultivo, los otros dos pacientes restantes presentaron diferentes genotipos en ambas muestras. En la Figura 1 se muestra el dendrograma de similitud de las cepas estudiadas.

Sin embargo, en aquellos pacientes en los que se observaron diferentes genotipos tanto en las muestras de sangre como en las de la punta del catéter, no se pudo excluir que el genotipo presente en una proporción baja no se detectara. Por tratarse de un estudio retrospectivo una limitación del trabajo fue el trabajar con una sola colonia por placa cuando solamente la recogida prospectiva de cepas del cultivo de la punta del catéter y el hemocultivo de pacientes con CRC permitiría observar si estos episodios están causados por uno o más clones.

Para esclarecer este problema, se estudiaron prospectivamente las muestras de sangre y cultivos de la punta del catéter de pacientes con CRC causada *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Para poder estudiar la policlonalidad de *Candida* en ambos compartimentos, se optó por subcultivar hasta 10 colonias diferentes del cultivo de la punta del catéter y 10 colonias del hemocultivo. Las 20 cepas de cada paciente fueron genotipadas independientemente. Este estudio prospectivo fue otro de los objetivos que se cubrieron en este proyecto.

Objetivos

1. Determinar y comparar la actividad antifúngica *in vitro* de arasertaconazol nitrato frente a aislados clínicos pertenecientes a las especies más relevantes causantes de vulvovaginitis candidiásica o candidiasis invasora. Como comparadores se eligieron clotrimazol, miconazol y fluconazol.
2. Establecer rangos de CMI de arasertaconazol aceptables frente a cepas de colección ATCC, según lo indicado en el documento del CLSI M27-A3. Para poder evaluar la reproducibilidad del método intra e inter laboratorio se trabajó con diversos lotes del fármaco y del medio de cultivo empleado (RPMI).
3. Determinar la presencia de genotipos idénticos de *C. albicans* y *C. parapsilosis* en muestras de hemocultivos y cultivos de la punta de catéter en pacientes con CRC causada por *C. albicans* o *C. parapsilosis*.

Materiales y Métodos

Estudio de la actividad *in vitro* de arasertaconazol frente a especies de *Candida*

Cepas: Se estudiaron 160 cepas de diferentes especies de *Candida*, obtenidas a partir de cultivos primarios; 50 cepas de *C. albicans*, 50 de *C. glabrata*, 20 cepas de *C. parapsilosis*, 20 de *C. tropicalis* y 20 de *C. krusei*. También se incluyeron las cepas ATCC: *C. krusei* ATCC 6258, *C. albicans* ATCC 64548, *C. albicans* ATCC 64550, *C. tropicalis* ATCC MY1012, *C. glabrata* ATCC 90030, *S. cerevisiae* ATCC 9763, *C. lusitanae* ATCC 2819.

El inóculo de cada cepa se preparó siguiendo las recomendaciones del documento CLSI M27-A3 [6]. Cada suspensión de levaduras se ajustó al 0,5 McFarland, lo que equivale a 1×10^6 - 5×10^6 células/ml; posteriormente, esta suspensión se diluyó al 1:1000 en agua y luego 1:20 en RPMI, lo que resultó en una suspensión final de 5×10^2 - $2,5 \times 10^3$ células/ml.

Reactivos: RPMI 1640 tamponado con MOPS a pH=7. Arasertaconazol nitrato: Lote 1: A08261A (Ferrer), pureza 100%; miconazol (Sigma), pureza 98%; clotrimazol (Sigma), Pureza 98,9%; fluconazol, pureza 98% (Pfizer).

Estudios de sensibilidad antifúngica: El ensayo de microdilución se llevó a cabo según la metodología descrita en el documento CLSI M27-A3 [6]. Las concentraciones de antifúngico estudiadas tras preparar los stocks en DMSO o agua (para el caso de fluconazol) fueron los siguientes: Arasertaconazol, Clotrimazol y Miconazol 0,0075-8 µg/ml; fluconazol 0,625-64 µg/ml.

Cada concentración se preparó 2X y se dispensaron 100µl de cada una en placas de microdilución de 96 pocillos, luego se inocularon 100µl de levadura preparada en los inóculos descritos anterioremente en cada pocillo quedando la concentración final deseada.

La lectura de la sensibilidad se realizó a las 24h y 48h de incubación, tomando en cuenta las CMI establecidas en el CLSI M27-A3 [6].

Establecimiento de rangos de control de calidad para arsertaconazol nitrato

Cepas: Se utilizaron las cepas ATCC: *C. krusei* ATCC 6258, *C. albicans* ATCC 64548, *C. albicans* ATCC 64550, *C. tropicalis* ATCC MY1012, *C. glabrata* ATCC 90030, *S. cerevisiae* ATCC 9763, *C. lusitaniae* ATCC 2819. El inoculo se preparó siguiendo los aspectos planteados en el documento CLSI M27-A3, tal y como se mencionó anteriormente.

Reactivos: Tres lotes diferentes de medio RPMI 1640 tamponado con MOPS pH=7. Lote A: 127K83042. Lote B: 041M8304. Lote C: 091M8301. Arsertaconazol nitrato: Lote 1: A08261A. Pureza 100%. Lote 2: A07041A. Pureza 100%. (Ferrer). Miconazol, pureza 98% (Sigma); fluconazol, pureza 98% (Pfizer).

Sensibilidad: El ensayo de microdilución se llevó a cabo según la metodología descrita en el documento CLSI M27-A3 [6]. Las concentraciones de antifúngico estudiadas tras preparar los stocks en DMSO o agua (para el caso de fluconazol) fueron los siguientes: Arsertaconazol y Miconazol 0,0075-8 µg/ml; fluconazol 0,625-64 µg/ml.

Cada concentración se preparó 2X y se dispensaron 100µl de cada una en placas de microdilución de 96 pocillos, luego se inocularon 100µl de levadura preparada en los inóculos anteriormente descritos en cada pocillo quedando la concentración final deseada. Cada antifúngico se preparó con los diferentes medios de RPMI y se realizaron 5 réplicas de cada cepa ATCC por cada lote de arsertaconazol.

La lectura de la sensibilidad se realizó a las 24h y 48h de incubación, siguiendo los parámetros antes descritos recomendados por el documento CLSI M27-A3 [6].

Tipado molecular de *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*

Para el estudio de tipado de cepas provenientes de pacientes con CRC se analizaron 8 pacientes con CRC debida a *C. albicans* y 5 pacientes con CRC debida a *C. parapsilosis*. En total, se genotiparon 100 cepas de *C. parapsilosis* y 160 cepas de *C. albicans*.

Las cepas fueron identificadas con métodos convencionales (API 32C, bioMérieux), y posteriormente confirmadas tras identificación molecular mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2.

Tipado de *C. albicans*

Se utilizó un panel de 6 marcadores de microsatélites (CAI, CAIII, CAVI, CDC3, EF3 HIS3) descritos previamente [9-12], que se encuentran resumidos en la Tabla 2.

Loci de Microsatélites	Secuencia del primer	Marcador
CAI	Forward: 5'-ATGCCATTGAGTGGAAATTGG-3' Reverse: 5'-AGTGGCTTGTGTTGGTTTT-3'	FAM
CAIII	Forward: 5'-TTGGAATCACTTCACCAGGA-3' Reverse: 5'-TTTCCGTGGCATCAGTATCA-3'	NED
CAVI	Forward: 5'-ACAATTAAGAAATGGATTTTAGTCAG-3' Reverse: 5'-TGCTGGTGCTGCTGGTATTA-3'	HEX
CDC3	Forward: 5'-CAGATGATTTTTTGTATGAGAAGAA-3' Reverse: 5'-CAGTCACAAGATTAATAATGTTCAAG-3'	FAM
EF3	Forward: 5'-TTTCCTCTTCCTTCATATAGAA-3' Reverse: 5'-GGATTCACTAGCAGCAGACA-3'	NED
HIS3	Forward: 5'-TGGCAAAAATGATATTCCAA-3' Reverse: 5'-TACACTATGCCCAAACACA-3'	HEX

Tabla 2: Microsatélites para el tipado de *C. albicans*

Condiciones de la PCR: Las reacciones de amplificación para el tipado de *C. albicans*, se llevan a cabo en 5 reacciones de PCR, primero dos reacciones: una multiplex con los marcadores CAI/CAIII y otra con el marcador CAVI y posteriormente tres PCR en singleplex para los marcadores CDC3, EF3 y HIS3.

Para la reacción Multiplex de los marcadores CAI/CAIII y la reacción Singleplex del marcador CAVI se utilizaron 3 µl de DNA en 25µl de volumen final de reacción conteniendo 1X de Buffer de PCR, 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de Cl₂Mg, 0,5 µM de cada pareja de los primeros CAI/III con 2U de Taq polimerasa y 0,36µM de la pareja de primers de CAVI con 1,5U de Taq polimerasa.

Para la Reacción singleplex de los marcadores CDC3, EF3 y HIS3 se utilizaron 3 µl de DNA en 25µl de volumen final de reacción conteniendo 1X de Buffer de PCR, 0,2 mM de dNTPs, 3 mM de Cl₂Mg, 0,2 µM de los primers CDC3 y 0,36µM de EF3 y HIS3 con 1U de Taq polimerasa para iniciar la reacción.

El programa de PCR fue igual para todas las amplificaciones, consistiendo en una desnaturalización inicial a 94°C durante 10 min, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 30seg, 55°C durante 1 min, 72°C durante 1min con un paso final de extensión a 72°C durante 10min. Para la PCR se utilizó un termociclador Biometra T-Gradient (Cultek)

Tipado de *C. parapsilosis*

Para el análisis de cepas de *C. parapsilosis*, se utilizó un conjunto de 4 marcadores de microsatélites (CP1, CP4a, CP6 y B) descritos previamente [8,11] que se pueden observar en la Tabla 3.

Loci de Microsatelites	Secuencia del primer	Marcador
CP1	Forward: 5'-AAA GTG CTA CAC ACG CAT CG-3' Reverse: 5'-GGC TTG CAA TTT CAT TTC CT-3'	NED
CP4a	Forward: 5'-CGG TAT TGC GGA AAA ATT CA-3' Reverse: 5'-TCG CTT GGA CAA AAA ATT CA-3'	HEX
CP6	Forward: 5'-CAG GAA CAG AAT GGT GA-3' Reverse: 5'-TCT GGA GCC TCT AGG TT-3'	FAM
B	Forward: 5'-AGG TTT GTA GTG TCC CTA TGG-3' Reverse: 5'-TAT CTC TCT CGC CAT TTG AAC G-3'	FAM

Tabla 3: Microsatélites para el tipado de *C. parapsilosis*

Condiciones de la PCR: Se realizan dos reacciones multiplex. Una primera reacción incluyó a los marcadores CP1 y CP6, y una segunda reacción a los marcadores CP4a y B.

Para ambas reacciones se utilizaron 3 µl de DNA genómico en 20µl de volumen final de reacción conteniendo 1X de Buffer de PCR, 0,25 mM de dNTPs, 1,875 mM de Cl₂Mg, y 0,3 µM de cada pareja de primer, según la reacción de PCR comentada. Por último se añadieron 1,5 U de Taq polimerasa para dar inicio a las reacciones de amplificación.

El programa de PCR fue igual para las dos reacciones, consistiendo en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 30seg, 55°C durante 30 seg, y 72°C durante 1 minuto con un paso final de extensión a 72°C durante 7 minutos. Para la PCR se utilizó un termociclador Biometra T-Gradient (Cultek)

Electroforesis capilar

La electroforesis capilar se llevó a cabo en el analizador genético 3130xl (Applied Biosystems, Inc).

Análisis de los tamaños de los fragmentos y genotipado: El tamaño de los alelos fue determinado automáticamente utilizando el software GeneMapper 4.0. Los datos del tipado se introdujeron en el software BioNumerics 6.0.1. Las coincidencias entre cepas de sangre y la punta de catéter se confirmaron cuando en ambas muestras aparecía el mismo patrón de STR.

Antifúngico	Arasertaconazol		Fluconazol		Miconazol		Clotrimazol	
	CMI ₉₀	rango	CMI ₉₀	rango	CMI ₉₀	rango	CMI ₉₀	rango
<i>C. albicans</i>	0.25	0.062-4	0.5	0.125-16	4	0.25-8	0.5	1-16
<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.031-4	0.5	0.25-16	2	0.125-8	0.25	2-16
<i>C. tropicalis</i>	1	0.25-8	2	0.25-16	4	0.25-8	0.5	2-16
<i>C. glabrata</i>	2	0.25-32	8	1-32	4	0.5-8	2	2-16
<i>C. krusei</i>	1	0.25-32	64	32-128	2	0.5-4	1	2-8
Total	1	0.062-32	2	0.125-128	2	0.125-8	1	1-16

Tabla 4: Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los antifúngicos estudiados frente a las cepas de *Candida* spp. La CMI se presenta como CMI₉₀ (µg/ml)

ATTCs	CMI ₉₀ (µg/ml)					
	(rango)					
	Arasertaconazol Lote 1			Arasertaconazol Lote 2		
	RPMI A	RPMI B	RPMI C	RPMI A	RPMI B	RPMI C
6258 (<i>C. krusei</i>)	2 (0.5-16)	2 (0.5-16)	2 (0.5-16)	2 (0.5-16)	2 (0.5-16)	2 (0.5-16)
64548 (<i>C. albicans</i>)	0.25 (0.062-4)	0.25 (0.062-4)	0.25 (0.062-4)	0.25 (0.062-4)	0.25 (0.062-4)	0.25 (0.062-4)
64550 (<i>C. albicans</i>)	1 (0.25-2)	1 (0.25-2)	1 (0.25-2)	1 (0.25-2)	1 (0.25-2)	1 (0.25-2)
1012 (<i>C. tropicalis</i>)	0.25 (0.125-16)	0.25 (0.125-16)	0.25 (0.125-16)	0.25 (0.125-16)	0.25 (0.125-16)	0.25 (0.125-16)
90030 (<i>C. glabrata</i>)	2 (0.5-16)	2 (0.5-16)	2 (0.5-16)	2 (0.5-16)	2 (0.5-16)	2 (0.5-16)
9763 (<i>S. cerevisiae</i>)	1 (0.25-2)	1 (0.25-2)	1 (0.25-2)	1 (0.25-2)	1 (0.25-2)	1 (0.25-2)
2819 (<i>C. lusitaniae</i>)	0.25 (0.062-4)	0.25 (0.062-4)	0.25 (0.062-4)	0.25 (0.062-4)	0.25 (0.062-4)	0.25 (0.062-4)

Tabla 5: Rangos de Concentración mínima inhibitoria (CMI) de arasertaconazol frente a cepas ATCC de *Candida* spp. (Resultados orientativos)

Resultados

Estudio de la actividad antifúngica del arasertaconazol nitrato y establecimiento de rangos de control de calidad frente a cepas ATCC de *Candida* spp.

El estudio de la actividad antifúngica del arasertaconazol es un proyecto en colaboración con Laboratorios Ferrer (Industria Farmacéutica) y puesto que se trata de un fármaco nuevo en evaluación los resultados obtenidos son confidenciales.

Sin embargo, en la tabla 4, se recogen unos resultados orientativos de las CMI₉₀ obtenidas para arasertaconazol nitrato comparadas con otros imidazoles expresadas como la CMI₉₀ que se refiere a la concentración de antifúngico que inhibe 90% de los aislados (percentil 90) [6] y en la tabla 5 se presentan las CMI₉₀ de Arasertaconazol frente a cepas ATCC de *Candida* spp igualmente expresadas como CMI₉₀, es importante mencionar que los fármacos empleados como comparadores se encontraban entre sus rangos de CMI₉₀ normales.

Paciente	Cepas aisladas	Tipo de muestra	Marcadores						Genotipos
			CAI	CAIII	CAVI	CDC3	EF3	HIS3	
A	10	Sangre	228-252	95-95	234-246	112-116	129-135	149-162	Idénticos
	10	Cateter	228-252	95-95	234-246	112-116	129-135	149-162	
B	10	Sangre	234-261	95-109	295-302	116-124	125-125	217-225	Idénticos
	9	Cateter	234-261	95-109	295-302	116-124	125-125	217-225	
C	10	Sangre	228-228	98-98	246-265	116-124	130-130	162-183	Idénticos
	9	Sangre	228-228	98-98	246-265	116-124	130-130	162-183	
	2	Cateter	228-228	98-98	246-265	116-124	130-130	162-183	
D	9	Sangre	243-285	95-109	246-284	116-124	125-134	162-203	Idénticos
	2	Cateter	243-285	95-109	246-284	116-124	125-134	162-203	
	1	Cateter	243-285	95-109	246-284	116-124	125-134	162-203	

Tabla 6: Genotipos de las cepas de *C. albicans* aisladas de catéter y sangre de 4 pacientes.

Paciente	Cepas aisladas	Tipo de muestra	Marcadores				Genotipos
			CP1	CP6	CP4a	B	
A	10	Sangre	225-246	271-319	300-300	129-129	Idénticos
	10	Cateter	225-246	271-319	300-300	129-129	
	1	Cateter	225-246	271-319	300-300	129-129	
B	10	Cateter	249-266	322-322	325-325	113-127	Idénticos
	10	Sangre	249-266	322-322	325-325	113-127	

Tabla 7: Genotipos de las cepas de *C. parapsilosis* aisladas de catéter y sangre de 2 pacientes

Análisis genético de cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* causantes de CRC

El 100% de los pacientes analizados: 8 pacientes con CRC causada por *C. albicans* y 5 pacientes con CRC producida por *C. parapsilosis*, presentaron un genotipo idéntico en las cepas aisladas de hemocultivo y en el cultivo de la punta de catéter, en las tablas 6 y 7 se recogen como resumen los resultados de 4 pacientes con CRC causada por *C. albicans* y 2 pacientes con CRC causada por *C. parapsilosis*.

Conclusiones

1. La actividad antifúngica de Arasertaconazol Nitrato frente a aislados clínicos de *Candida* spp. es comparable con la actividad de otros imidazoles.

2. Se estableció la CMI para Arasertaconazol frente a cepas ATCC obteniéndose rangos aceptables para el control de Calidad y poder evaluarse la actividad antifúngica de éste fármaco inter laboratorio.
3. La caracterización molecular de cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* causantes de CRC confirmó que la definición de CRC basada en la identificación morfológica de los aislados es precisa.
4. Existe una alta diversidad genotípica en los aislados de *C. albicans* y *C. parapsilosis* causantes de fungemia.

Referencias

1. Pfaller, M.A. and D.J. Diekema. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 20(1): 133-63.
2. Pappas, P.G., C.A. Kauffman, D. Andes, D.K. Benjamin, Jr., T.F. Calandra, J.E. Edwards, Jr., S.G. Filler, J.F. Fisher, B.J. Kullberg, L. Ostrosky-Zeichner, A.C. Reboli, J.H. Rex, T.J. Walsh, and J.D. Sobel. 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 48(5): 503-35.
3. Sanglard, D., A. Coste, and S. Ferrari. 2009. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.* 9(7): 1029-50.
4. Ghannoum, M.A. and L.B. Rice. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 12(4): 501-17.
5. Arendrup, M.C., M. Cuenca-Estrella, C. Lass-Flörl, and W. Hope. 2012. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect.* 18(7): E246-E47.
6. CLSI. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, 3rd ed. Approved Standard. CLSI M27-A3 (28). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA. .
7. Mermel, L.A., M. Allon, E. Bouza, D.E. Craven, P. Flynn, N.P. O'Grady, Raad, II, B.J. Rijnders, R.J. Sherertz, and D.K. Warren. 2009. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 49(1): 1-45.
8. Sabino, R., P. Sampaio, L. Rosado, D.A. Stevens, K.V. Clemons, and C. Pais. 2010. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates. *J Clin Microbiol.* 48(5): 1677-82.
9. Sampaio, P., L. Gusmao, C. Alves, C. Pina-Vaz, A. Amorim, and C. Pais. 2003. Highly polymorphic microsatellite for identification of *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol.* 41(2): 552-7.
10. Sampaio, P., L. Gusmao, A. Correia, C. Alves, A.G. Rodrigues, C. Pina-Vaz, A. Amorim, and C. Pais. 2005. New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. *J Clin Microbiol.* 43(8): 3869-76.
11. Vaz, C., P. Sampaio, K.V. Clemons, Y.C. Huang, D.A. Stevens, and C. Pais. 2011. Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 71(2): 159-62.
12. Botterel, F., C. Desterke, C. Costa, and S. Bretagne. 2001. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J Clin Microbiol.* 39(11): 4076-81.13. Escribano, P., J. Guinea, S. Recio, T. Peláez, M. Rodríguez-Cr eixems, P. Mu oz, and E. Bouza. 2012. Can phenotyping alone confirm catheter-related fungemia caused by *Candida albicans*? *J Clin Microbiol.* En revisi n.