



Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp: la importancia de vigilar también cepas de la comunidad

Claudio Alburquenque, Sebastián Beltrán, Roberto Olivares, Mary A. Falconer, José Amaro, Marisol Fuentes y Cecilia V. Tapia

Universidad Mayor,
Santiago, Chile.

Escuela de Tecnología
Médica (CA, SB).

Clínica Dávila, Santiago, Chile.

Laboratorio Central (RO).

Universidad de Chile, Santiago.

Facultad de Medicina,

Instituto de Ciencias Biomédicas

Programa de Microbiología y

Micología (MAF, JA, MF, CVT).

No existen conflictos de interés.

Financiamiento: Fondos internos de

Clínica Dávila, Proyecto Fondecyt de

Iniciación 11110160.

Recibido: 30 de octubre de 2012

Aceptado: 6 de mayo de 2013

Correspondencia a:

Cecilia V. Tapia P.

cetapia@med.uchile.cl

Species distribution and susceptibility pattern of *Candida* spp.: the importance to survey also strains isolated from the community

Background: The most of the surveillance studies has been conducted in hospitalized patients with invasive infections. Recently, new clinical breakpoints (CBPs) have been proposed for antifungal susceptibility testing and epidemiological cutoffs (ECVs). **Aim:** To evaluate species distribution and susceptibility pattern of *Candida* spp. obtained from in and outpatients in a period of 6 months. **Material and Methods:** The isolates (n=223) came from vaginal discharge (51.6%), lower respiratory tract (24.7%), urine (20.2%), wounds (1.8%), blood (0.9%), peritoneal fluid (0.4%) and nails (0.4%). **Results:** The species distribution was *C. albicans* 84.8% (n: 189), *C. glabrata* 7.6% (n: 17), *C. tropicalis* 2.7% (n: 6), *C. parapsilosis* 2.2% (n: 5), *C. kefyr* 0.9% (n: 2) and others 1.8% (*C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. intermedia*) (n: 4). The susceptibility dose dependence (SDD) and resistance were 3.2% for fluconazole and 2.2% for voriconazole. The most of SDD and resistant strains were isolated from ambulatory patients. Also, a higher percentage of MICs over the new CBPs and ECVs were found in strains from ambulatory patients and especially in *C. glabrata* isolates to caspofungin. **Conclusion:** Taking into consideration that most of the invasive infections are caused by strains from the endogenous microbiota, and that there is a resistant population of *Candida* spp. in the community, should be important to include in surveillance studies strains isolated from ambulatory patients.

Key words: *Candida*, susceptibility, resistance, surveillance.

Palabras clave: *Candida*, susceptibilidad, resistencia, vigilancia.

Introducción

Las especies del género *Candida* son levaduras comensales que colonizan el tracto gastrointestinal y genital, siendo *C. albicans* la más estudiada¹. Estos microorganismos son oportunistas, ya que en determinadas circunstancias son capaces de proliferar e invadir, transformándose en patógenos. Las especies de *Candida* dan cuenta de casi 15% de las infecciones adquiridas en el hospital, y más de 72% de las infecciones intrahospitalarias por hongos² mientras que la candidemia, presenta una mortalidad de hasta 60%³.

En los últimos años, y en relación a la aparición de nuevos fármacos antifúngicos, la epidemiología de las infecciones por *Candida* ha cambiado, con un aumento de las especies no-*albicans* en infección fúngica invasora, hecho descrito en estudios nacionales e internacionales⁴⁻⁶. Algunas especies no-*albicans* tienden a ser más resistentes a los antifúngicos; por ejemplo, *C. glabrata*, puede presentar resistencia a fluconazol y equinocandinas. Estos cambios en la epidemiología de *Candida* spp., también

han sido detectados en infecciones superficiales, que no comprometen la vida^{7,8}.

La resistencia *in vitro* a estos agentes se ha asociado a falla terapéutica y a recurrencia durante el tratamiento, por lo que es importante conocer la susceptibilidad a antifúngicos de las levaduras del género *Candida* y vigilarla⁴.

Por muchos años, se han utilizado los puntos de corte clínicos para *Candida* spp. disponibles en el documento M27-A3 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁹. Recientemente, estos puntos de corte han sido revisados y se han propuesto nuevos puntos de corte clínicos (CBPs) y además, puntos de corte epidemiológicos (*epidemiological cutoff values*-ECVs), para varias especies de *Candida* diferentes a familias de antifúngicos (Tabla 1). Estos incluyen azoles (fluconazol, itraconazol y voriconazol)^{4,10,11} equinocandinas (caspofungina, anidulafungina y micafungina)¹², y polienos (anfotericina B)¹³. Los nuevos CBPs, se establecieron de acuerdo a la especie de *Candida*, pues se observó que había diferencias en los rangos de CIM de acuerdo a la especie. Por otra parte, los ECVs permiten específicamente detectar la emergencia



de resistencia a antifúngicos, ya que detectan cepas no silvestres, es decir, cepas que presentan algún mecanismo de resistencia a los antifúngicos⁴.

La mayoría de los estudios de vigilancia se ha realizado en pacientes hospitalizados con infecciones fúngicas invasoras^{7,14-18}; sólo algunos trabajos han incluido cepas de localizaciones superficiales y de pacientes ambulatorios en estudios epidemiológicos^{19,20}.

Clínica Dávila es un centro hospitalario de nivel terciario que atiende además a pacientes ambulatorios. En un trabajo previo con cepas de *Candida*²⁰, se encontró que la mayor cantidad de cepas resistentes y sensibles dosis dependiente (SDD) a fluconazol o fueron aisladas de pacientes ambulatorios, específicamente de flujo vaginal, y que la especie más resistente fue *C. glabrata*.

El objetivo de este trabajo, fue estudiar la susceptibilidad de cepas del género de *Candida* aisladas de pacientes hospitalizados y ambulatorios durante 2011, a cinco antifúngicos, utilizando los puntos de corte del CLSI, los nuevos puntos de corte propuestos y los puntos de corte epidemiológicos.

Materiales y Métodos

Cepas clínicas. Un total de 223 cepas fueron recolectadas consecutivamente entre enero y junio de 2011. Se incluyen cepas de pacientes hospitalizados (n = 94) y ambulatorios (n = 129) de Clínica Dávila. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la institución. La información demográfica fue registrada protegiendo la identidad del paciente.

Identificación y pruebas de susceptibilidad antifúngica. Los aislados fueron identificados por métodos convencionales como tubo germinal, microcultivo, agar cromogénico (CHROMagar *Candida*)²¹ y API 32C® (Biomerieux, Chile)²¹. Las pruebas de susceptibilidad antifúngica a anfotericina B, fluconazol, voriconazol, caspofungina y anidulafungina se realizaron según el documento CLSI M27A3⁹. Brevemente, los fármacos fueron diluidos en agua (hidrofilicas) y en dimetil sulfoxido (hidrofóbicas), obteniendo una solución madre de 5.120 y 1.600 mg/mL, respectivamente. Luego se realizaron diluciones en RPMI 1640 con L-glutamina y tamponado con MOPS (Sigma Aldrich®), para finalmente cargar la micro-placa con 100 µg/mL de las de concentraciones decrecientes de los antifúngicos, para llegar a una concentración final de 64 a 0,125 mg/mL para fluconazol y 16-0,0313 mg/mL para el resto de los antifúngicos. Las levaduras en estudio fueron preparadas en agua destilada estéril a una concentración inicial de 1-5 x 10⁶ ufc/mL posteriormente diluidas 1:50, para finalmente diluirlas en RPMI 1640 con L-glutamina y MOPS (1:20). Posteriormente se agregaron 100 µL del inóculo en las microplacas que contenían las distintas

concentraciones del fármaco. La concentración final de las levaduras en cada pocillo fue de 0,5-2,5 x 10³ ufc/mL. Como control de crecimiento se utilizó el solvente más inóculo y como control negativo se usó agua destilada. En cada ensayo se utilizaron las cepas control del *C. krusei* ATCC 6258, y *C. parapsilosis* ATCC 22019. Las cepas fueron clasificadas como susceptibles (S), susceptible dosis dependiente (SDD) o resistentes (R), de acuerdo a los puntos de corte clínicos del CLSI para cada antifúngico. Para algunos fármacos, como las equinocandinas, se utiliza la categoría no susceptible (NS) en lugar de R. Además se aplicaron los nuevos puntos de corte clínicos (CBP) que son especie específicos. Los ECVs se utilizaron para discriminar cepas silvestres de cepas algún grado de resistencia. La Tabla 1 muestra los puntos de corte del CLSI actuales y los CBP nuevos propuestos por especie y los ECVs.

Análisis estadístico. Se utilizó una estadística descriptiva y los datos se analizaron con el programa Graph Pad Prism 5 softwareTM.

Resultados

Las cepas fueron aisladas de flujo vaginal (51,6%), vías respiratorias inferiores (24,7%), orina (20,2%), heridas (1,8%), sangre (0,9%), líquido peritoneal (0,4%) y uñas (0,4%) (Figura 1). En los pacientes hospitalizados, las especies de *Candida* fueron recuperadas principalmente de la vía aérea (50,5%), incluyendo lavados bronquio-alveolares y aspirado traqueal y muestras de orina (41,1%), mientras que en los pacientes ambulatorios las cepas se aislaron principalmente de flujo vaginal (87,6%) (Dato no mostrado).

En nuestra institución, la especie más frecuentemente aislada fue *C. albicans* (84,8%), tanto en pacientes hospitalizados como ambulatorios, seguido por *C. glabrata* (7,6%), *C. tropicalis* (2,7%), *C. parapsilosis* (2,2%), *C. kefyr* (0,9%) y otros como *C. guilliermondi*, *C. krusei*, y *C. intermedia* y *C. lusitaniae* (1,8%). Una mayor cantidad de especies no-*albicans* se encontró en pacientes ambulatorios; siendo *C. glabrata* la más frecuente en este grupo. Por otro lado, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* fueron aisladas de pacientes hospitalizados (Figura 2).

Candida albicans es la especie más frecuente en todos los grupos de etarios, tanto en pacientes ambulatorios como en hospitalizados, mientras que *C. glabrata* se aisló sólo en pacientes mayores de 15 años (Figuras 3A y B). Por otra parte, *C. parapsilosis* se aisló sólo en pacientes adultos hospitalizados (Figura 3B).

En pacientes ambulatorios, las especies de *Candida*, se aislaron principalmente de flujo vaginal en mujeres (Figura 4A). En pacientes hospitalizados *Candida* spp fueron aisladas del tracto respiratorio inferior (mayor proporción en hombres) y en orina (mayor proporción en mujeres) (Figura 4B).



Tabla 1. Puntos de corte CLSI de acuerdo al estándar M27-A3, nuevos puntos de corte propuestos (CBPs) y valores epidemiológicos de corte (ECVs)

	Puntos de corte CLSI, documento M27A-3 (µg/mL)				
	Fluconazol	Voriconazol	Anfotericina B	Caspofungina	Anidulafungina
Susceptible	≤ 8	≤ 1	*	≤ 2	≤ 2
Susceptible dosis dependiente	16 - 32	2			
Resistente	≥ 64	≥ 4			
No-susceptible			*	> 2	> 2

Especies	Puntos de corte propuestos y valores epidemiológicos de corte (µg/mL), según <i>Candida</i> spp. a las 48 h de incubación									
	Fluconazol		Voriconazol		Anfotericina B		Caspofungina		Anidulafungina	
	CBP	ECV	CBP	ECV	CBP	ECV	CBP	ECV	CBP	ECV
<i>C. albicans</i>	2	0,5	0,125	0,03	*	2	0,25	0,125	0,25	0,125
<i>C. tropicalis</i>	2	2	0,125	0,125	*	2	0,25	0,125	0,25	0,125
<i>C. parapsilosis</i>	2	2	0,125	0,125	*	2	2	1	2	4
<i>C. lusitanae</i>	2	2		0,06	*	4		0,5		2
<i>C. glabrata</i>	32	32		1	*	2	0,125	0,125	0,125	0,25
<i>C. krusei</i>		128	0,5	1	*	4	0,25	0,25	0,25	0,125

*No hay CBPs establecidos para anfotericina B; sin embargo, algunos autores proponen que los aislados con CIM > 1 µg/mL, son considerados resistentes^{14,18}.

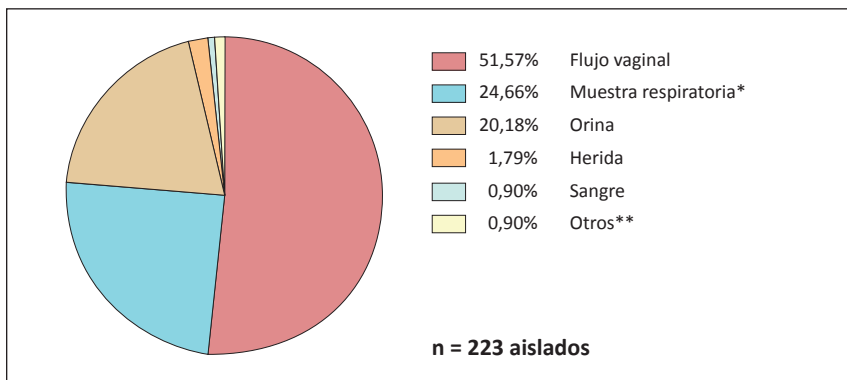


Figura 1. Distribución de *Candida* spp aisladas de acuerdo al tipo de muestras en pacientes hospitalizados y ambulatorios. *Las muestras de las vías respiratorias incluyen lavado bronquio-alveolar, aspirado bronquial en pacientes hospitalizados. También se incluye esputo en pacientes ambulatorios. **Corresponde a uñas y líquido peritoneal.

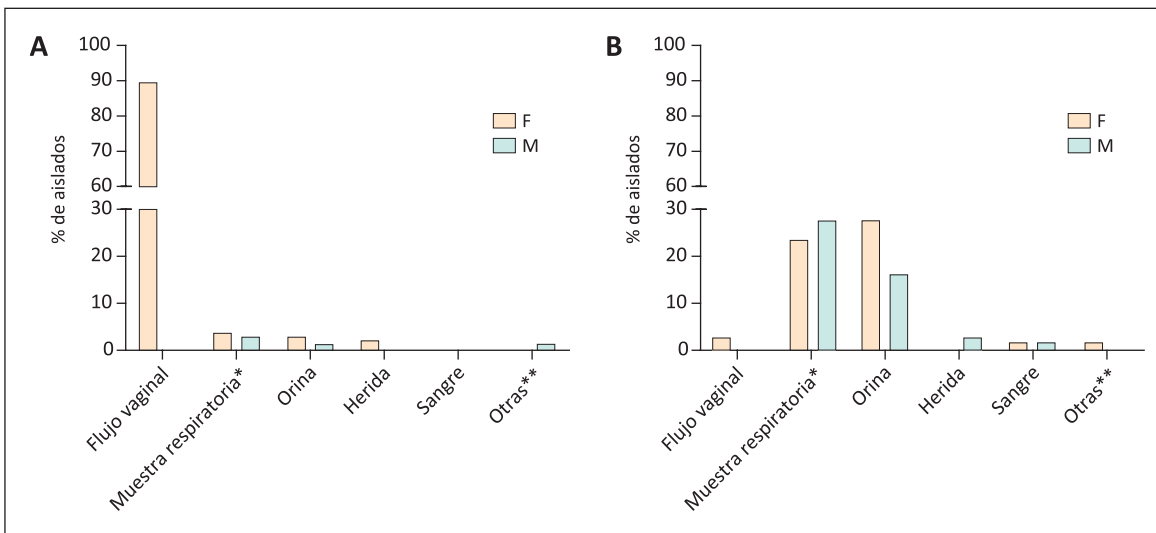
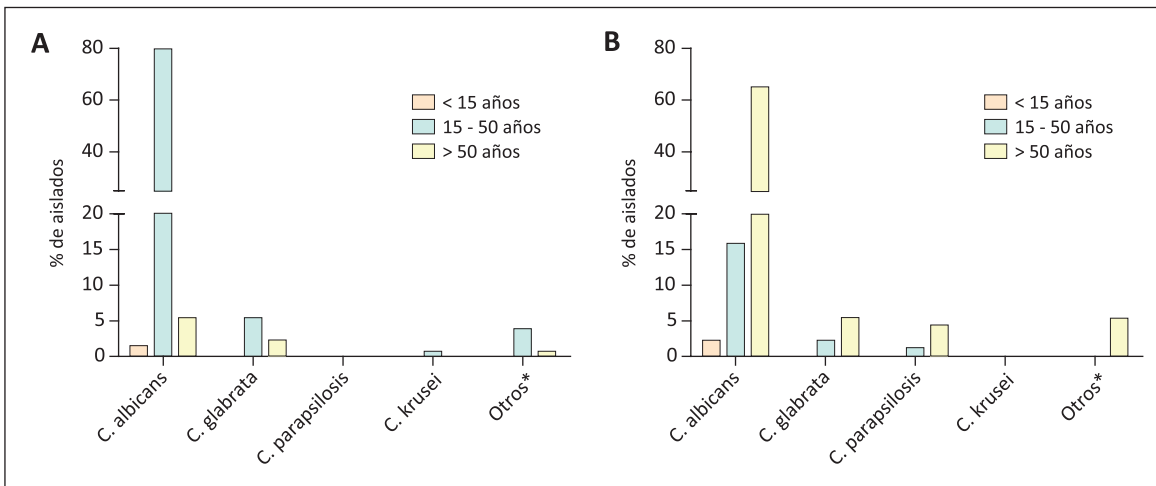
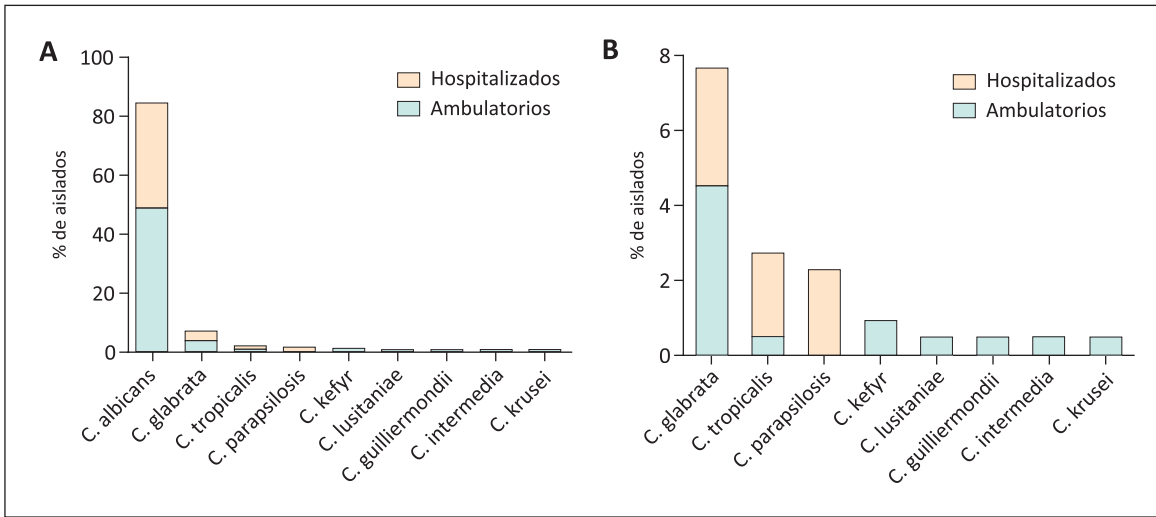
Los rangos de susceptibilidad de *Candida* spp. fueron: < 0,125 - > 64 mg/mL para fluconazol, < 0,0313 - > 16 mg/mL para voriconazol, < 0,0313-2 mg/mL para anfotericina B, < 0,0313-2 mg/mL para caspofungina y 0,0313-2 mg/mL para anidulafungina. La Figura 4 muestra, los rangos de susceptibilidad, mediana, CIM₉₀, CIM₅₀ para el total de las cepas (*Candida* spp.) (Figuras 5A), para *C. albicans* (Figuras 5B y Tabla 2) y para *C. glabrata* (Figura 5C y Tabla 2).

Por otra parte, se observó que existen cepas de *C. albicans* con CIMs por sobre los ECVs para todos los antifúngicos, excepto para anfotericina B mientras (Figuras 5 B y C, Tabla 2) mientras que sólo se encontraron cepas de *C. glabrata* con CIMs por sobre los ECVs para

caspofungina (Figuras 5C y Tabla 2).

La susceptibilidad dosis dependiente (SDD) y resistencia global fueron de 3,2% para fluconazol y 2,2% para voriconazol. La Tabla 2 muestra que *C. albicans* presentó 2,1% de resistencia a fluconazol según los puntos de corte originales del CLSI; sin embargo, el porcentaje de cepas con CIMs sobre los nuevos CBPs y ECVs fue de 9,5 y 23,3%, respectivamente. Lo mismo se observó con voriconazol, donde la resistencia fue de 1,6% y el porcentaje de cepas con CIM sobre los nuevos CBP y ECV fue de 11,6% para ambos. Aunque no se encontraron cepas resistentes para caspofungina según los puntos de corte disponibles actualmente, se encontró un gran porcentaje de cepas de *C. albicans* con CIM sobre los nuevos CBPs y ECVs, 50,8 y 83,1%, respectivamente. Un discreto porcentaje de cepas con CIMs sobre los CBPs y ECVs se encontró para anidulafungina (1,6 y 2,6%, respectivamente). Todos los aislados de *C. glabrata* en este estudio fueron susceptibles de acuerdo a los puntos de corte actuales del CLSI y no se encontraron cepas con CIMs sobre los CBPs y ECVs para todos los antifúngicos estudiados, exceptuando para caspofungina (70,6 y 82,4%, respectivamente).

Se observó un mayor porcentaje de *C. albicans* SDD y resistentes a fluconazol en cepas de pacientes ambulatorios que aquellas de pacientes hospitalizados (4,5 versus 1,3%, respectivamente). Lo mismo sucedió para voriconazol (2,7 versus 0%). Es importante señalar que en pacientes ambulatorios, se encontró un mayor porcentaje de *C. glabrata* sobre los nuevos CBPs y ECVs (72,7 y 81,8%, respectivamente) en comparación con los aislados de pacientes hospitalizados (66,7 y 45,5%) (Tabla 2).



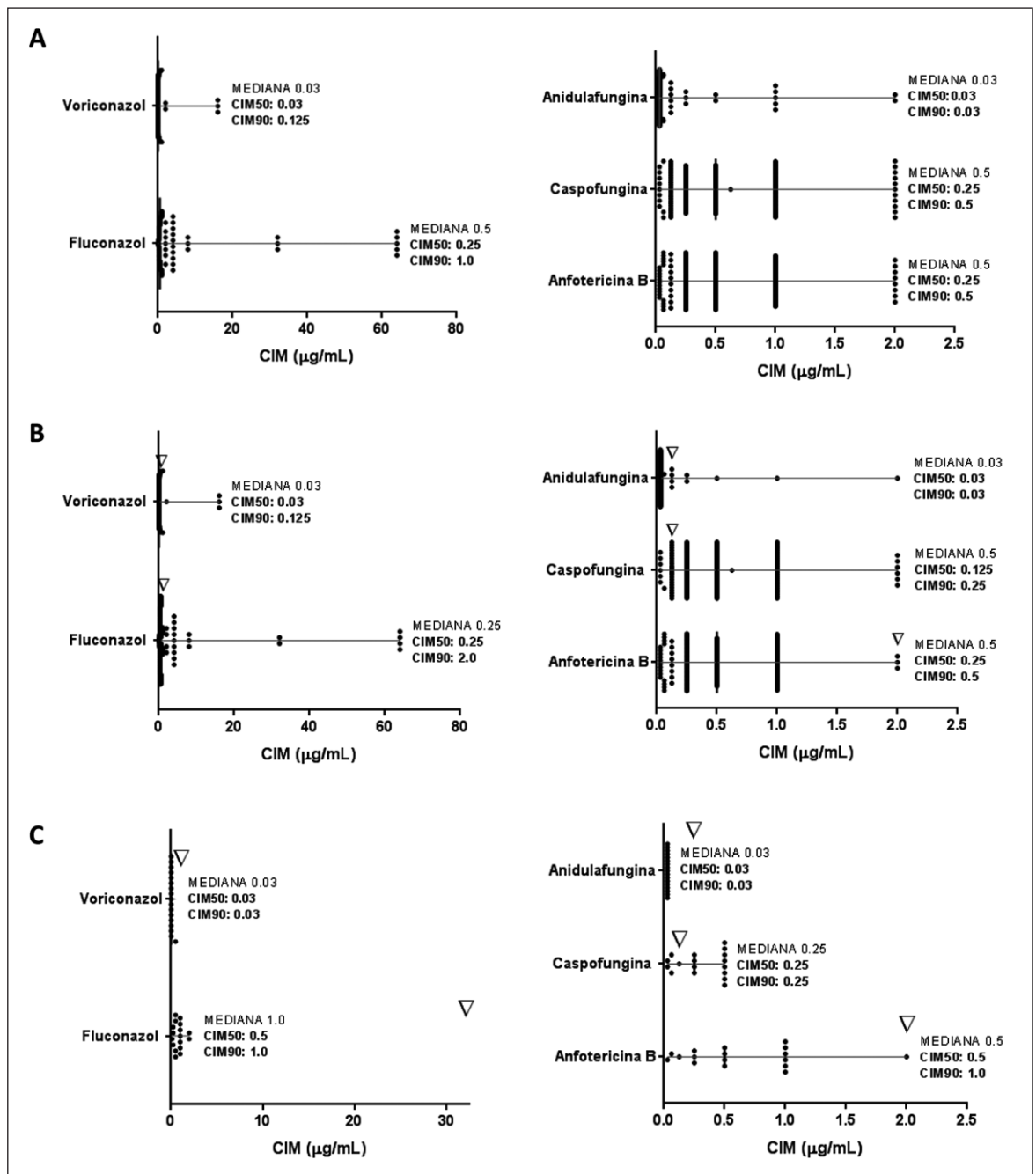


Figura 5. Distribución medianas, CIM₅₀ y CIM₉₀ de las susceptibilidades de (A) *Candida* spp. (B) *C. albicans* y (C) *C. glabrata* para los cinco antifúngicos testeados. El triángulo invertido (▽) muestra el punto de corte epidemiológico (ECV).

Discusión

Las infecciones por hongos han aumentado en número y en diversidad en los últimos años, principalmente debido al aumento de los pacientes con riesgo de infecciones invasoras²². También se ha descrito un aumento en la resistencia a agentes antifúngicos especialmente en cepas de *Candida* no-*albicans*, como *C. glabrata*^{4,23-25}.

En un estudio previo, los autores publicaron datos sobre *Candida* spp. aislados, tanto de pacientes hospitalizados como ambulatorios de Clínica Dávila, proviniendo las cepas más resistentes a fluconazol, de pacientes ambulatorios (flujos vaginales y orinas)²⁰. En el presente estudio se obtuvo resultados similares para fluconazol con un porcentaje mayor de cepas resistentes aisladas de pacientes ambulatorios. Adicionalmente se encontró un



Tabla 2. Proporción de aislados con CIMs sobre los actuales (CLSI) y los puntos de corte nuevos propuestos (CBPs) y los valores de corte epidemiológicos (ECVs)

	Fluconazol			Voriconazol			Anfotericina B			Caspofungina			Anidulafungina			n
	CLSI	Sobre CBP	Sobre ECV	CLSI	R	Sobre CBP	CLSI	NS	Sobre CBP	CLSI	NS	Sobre CBP	CLSI	NS	Sobre CBP	
Todos																
<i>C. albicans</i>	2 (1,1%)	4 (2,1%)	18 (9,5%)	1 (0,5%)	3 (1,6%)	22 (11,6%)	0	0	0	0	0	96 (50,8%)	0	0	3 (1,6%)	189
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	12 (70,6%)	0	0	0	17
<i>C. parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Hospitalizados																
<i>C. albicans</i>	0	1 (1,3%)	8 (10,3%)	0	0	10 (12,8%)	0	0	0	0	0	41 (52,5%)	0	0	0	78
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	4	0	0	0	6
<i>C. parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Ambulatorios																
<i>C. albicans</i>	2 (1,8%)	3 (2,7%)	10 (9,9%)	0	3 (2,7%)	12 (10,8%)	0	0	0	0	0	55 (49,5%)	0	0	3 (2,7%)	111
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	8	0	0	0	11
<i>C. parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

SDD: susceptible dosis dependiente; R: resistente; NS: no susceptible; * no hay puntos de corte nuevos propuestos.

porcentaje más alto de cepas de *C. glabrata* sobre los nuevos CBPs y ECVs para equinocandinas, especialmente caspofungina, aisladas de pacientes ambulatorios (Tabla 2).

Al igual que en el estudio previo, *C. albicans* continúa siendo la especie más frecuentemente aislada en Clínica Dávila (78,9% en 2007 y 84,8% en 2011), mientras que en otros estudios se ha descrito un aumento de las especies no-*albicans*^{3,26,27}.

En este estudio, las cepas de *C. glabrata* fueron recuperadas sólo de adultos y aisladas principalmente de flujo vaginal y orina. En un trabajo chileno de Silva y cols., se demostró una relación clonal entre *Candida* spp. aisladas de flujo vaginal e infección urinaria, en los pacientes de la unidad de cuidados intensivos. La colonización vaginal con cepas con algún grado de resistencia, pudiera tener importancia en pacientes de sexo femenino que desarrollan infección urinaria por *Candida* spp.²⁸.

Durante 2011, en Clínica Dávila, sólo se aislaron cepas de *C. parapsilosis* de pacientes adultos, lo cual contrasta con series previas, en que esta especie fue aislada principalmente de pacientes pediátricos^{6,18,20}. Esta diferencia podría explicarse por los cambios epidemiológicos relacionados al mayor uso de equinocandinas; se ha descrito que *C. parapsilosis* presenta CIMs más altas a estos antifúngicos²⁹.

Al analizar las CIMs, utilizando los puntos de corte del CLSI y los nuevos CBPs y ECVs, se observó que la mayoría de las cepas fueron sensibles de acuerdo al CLSI, pero un porcentaje más alto de cepas presentó CIMs sobre los nuevos CBPs, y los ECVs, principalmente en *C. albicans* frente a los azoles y caspofungina. Existe un bajo porcentaje de cepas sobre los nuevos ECVs y ECVs para anidulafungina, lo cual puede tener relación con que este antifúngico ha sido sólo recientemente incorporado en el mercado chileno³⁰. Hasta 2012, los nuevos puntos de corte clínicos propuestos no habían sido incorporados al estándar CLSI y este es el primer trabajo que evalúa los resultados de la susceptibilidad de las cepas de *Candida* con los nuevos CBPs. Este cambio en los puntos de corte es relevante, considerando que podría implicar la detección de un mayor número de cepas con algún grado de resistencia. Al aplicar los ECVs, se encontró un porcentaje importante de cepas no silvestres, es decir, que podrían tener algún mecanismo de resistencia⁴. Basándose en este hallazgo, parece necesario estudiar los mecanismos de resistencia probables de las cepas aisladas de la comunidad. Se han descrito la sobreexpresión de bombas de eflujo y mutaciones del gen *ERG11* en especies de *Candida* resistentes a triazoles^{4,10}, mientras que mutaciones en el gen *FKS* han sido implicadas en resistencia a equinocandinas CIM^{4,31}.

Los resultados de este estudio muestran que en la comunidad se encuentran cepas no silvestres de *Candida* spp. Esto puede estar relacionado al uso poco controlado de antifúngicos para tratar las candidiasis vulvo-vaginales en la comunidad³².

Dado que la mayoría de las infecciones invasoras son causadas por cepas de la microbiota endógena, debiera considerarse la inclusión de *Candida* spp. aisladas de pacientes ambulatorios en los estudios de vigilancia, especialmente en los centros de salud que atienden a este tipo de pacientes.



Agradecimientos. A la Dra. Paula Daza por gestionar los fondos para realizar este trabajo.

Resumen

Introducción: Los estudios de vigilancia de *Candida* spp. en general, no incluyen cepas de la comunidad. Recientemente, se han propuesto nuevos puntos de corte clínicos (CBPs) para interpretar la susceptibilidad y puntos de corte epidemiológicos (ECVs), para detectar cepas silvestres o con algún tipo de resistencia. *Objetivo:* Analizar la distribución y perfil de susceptibilidad *Candida* spp. de pacientes hospitalizados y ambulatorios durante seis meses. *Material y Métodos:* Las cepas (n: 223) provenían desde flujo vaginal (51,6%), tracto respiratorio bajo (24,7%), orina (20,2%),

heridas (1,8%), sangre (0,9%), líquido peritoneal (0,4%) y uñas (0,4%). *Resultados:* La distribución de especies fue *C. albicans* 84,8% (n: 189), *C. glabrata* 7,6% (n: 17), *C. tropicalis* 2,7% (n: 6), *C. parapsilosis* 2,2% (n: 5), *C. kefyr* 0,9% (n: 2) y otras 1,8% (*C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. intermedia*) (n: 4). La susceptibilidad dosis dependiente (SDD) y resistencia fueron de 3,2% para fluconazol y 2,2% para voriconazol. La mayoría de las cepas SDD resistentes y fueron ambulatorias. Además, en este grupo, se encontró un alto porcentaje de cepas con CIMs sobre los nuevos CPBs y ECVs, especialmente en aislados *C. glabrata* para caspofungina. *Conclusión:* Dado que la mayoría de las infecciones invasoras son causadas por cepas endógenas, y que hay cepas con algún grado de resistencia en la comunidad, estas últimas debieran vigilarse.

Referencias bibliográficas

- Jouault T, Sarazin A, Martínez-Esparza M, Fradin C, Sendid B, Poulain D. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cell Microbiol* 2009; 11 (7): 1007-15.
- Dismukes W E P P, Sobel J D. *Clinical Mycology*. 2003, 198 Madison Avenue, New York, New York 10016: Oxford University press.
- Das I, Nightingale P, Patel M, Jumaa P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *Int J Infect Dis* 2011; 15(11): e759-63.
- Pfaller M A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012; 125(1 Suppl): S3-13.
- Alvarado D, Díaz M C, Silva V. Identification and antifungal susceptibility of *Candida* spp isolated from invasive mycoses. Influence of growth inhibition percentage to determine minimal inhibitory concentration. *Rev Med Chile* 2002; 130 (4): 416-23.
- Silva V, Díaz M C, Febre N. Invasive fungal infections in Chile: a multicenter study of fungal prevalence and susceptibility during a 1-year period. *Med Mycol*. 2004; 42 (4): 333-9.
- Hajjeh R A, Sofair A N, Harrison L H, Lyon G M, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, et al. 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. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (4): 1519-27.
- Kao A S, Brandt M E, Pruitt W R, Conn L A, Perkins B A, Stephens DS, et al. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* 1999; 29 (5): 1164-70.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3. 2008.
- Pfaller M A, Andes D, Diekema D J, Espinel-Ingroff A, Sheehan D; CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat* 2010; 13 (6): 180-95.
- Pfaller M A, Andes D, Arendrup M C, Diekema D J, Espinel-Ingroff A, Alexander B D, et al. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70 (3): 330-43.
- Pfaller M A, Diekema D J, Andes D, Arendrup M C, Brown S D, Lockhart S R, et al. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat* 2011; 14 (3): 164-76.
- Pfaller M A, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema D J, Fothergill A, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (6): 2040-6. doi: 10.1128/JCM.00248-12.
- Messer S A., Jones R N, Fritsche T R. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *J Clin Microbiol* 2006; 44 (5): 1782-7.
- Pfaller M A, Jones R N, Doern G V, Sader H S, Hollis R J, Messer S A. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. The SENTRY Participant Group. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (7): 1886-9.
- Silva V D M, Febre N, red de diagnóstico en micología médica. Surveillance of antifungal drugs resistance in yeasts. *Rev Chilena Infectol*. 2002; 19 (Supl. 2): S149-156.
- Colombo A L, Nucci M, Park B J, Nouér S A, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006; 44 (8): 2816-23.
- Cordoba S V W, Bosco-Borgeat M E, Taverna C, Szusz W, Murisego O, Isla G, Davel G and the Red Nacional de Laboratorios de Micología, Argentina. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2011; 43: 176-85.
- Pfaller M A, Diekema D J, Gibbs D L, Newell V A, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* 2010; 48 (4): 1366-77.
- Albuquerque C, Hermosilla G, Tapia C.



- Species distribution and fluconazole susceptibility of yeasts of genus *Candida* isolated from hospitalized and ambulatory patients. *Rev Chilena Infectol* 2009; 26 (5): 435-9.
- 21.- Ramani R, Gromadzki S, Pincus D H, Salkin I F, Chaturvedi V. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (11): 3396-8.
- 22.- Lass-Flörl C, Perkhöfer S, Mayr A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses* 2010; 53 (1): 1-11.
- 23.- Alexander B D, Johnson M D, Pfeiffer C D, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of fks mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis*. 2013; *Clin Infect Dis*. 2013 Apr 2. [Epub ahead of print]
- 24.- Samaranayake Y H, Cheung B P, Wang Y, Yau J Y, Yeung K W, Samaranayake L P. Fluconazole resistance in *Candida glabrata* is associated with increased bud formation and metallothionein production. *J Med Microbiol* 2013; 62 (Pt 2): 303-18.
- 25.- Pfaller M A, Castanheira M, Lockhart S R, Ahlquist A M, Messer S A, Jones R N. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (4): 1199-203.
- 26.- Pfaller M A, Messer S A, Moet G J, Jones R N, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38 (1): 65-9.
- 27.- Sampaio Camargo T Z, Marra A R, Silva C V, Cardoso M F, Martino M D, Camargo L F, et al. Secular trends of candidemia in a tertiary care hospital. *Am J Infect Control* 2010; 38 (7): 546-51.
- 28.- Silva V, Hermosilla G, Abarca C. Nosocomial candiduria in women undergoing urinary catheterization. Clonal relationship between strains isolated from vaginal tract and urine. *Med Mycol* 2007; 45(7): 645-51.
- 29.- Tapia P C. An update on antifungal susceptibility testing. *Rev Chilena Infectol*. 2009; 26 (2): 144-50.
- 30.- Albuquerque O C, Silva A V, Fuentes G M, Tapia C C, Silva V V. In vitro andulafungin susceptibility of 100 of *Candida* strains obtained previously to the introduction of this echinocandin in Chile. *Rev Chilena Infectol*. 2011; 28 (5): 399-403.
- 31.- Ben-Ami R, Kontoyiannis D P. Resistance to echinocandins comes at a cost: the impact of FKS1 hotspot mutations on *Candida albicans* fitness and virulence. *Virulence* 2012; 3 (1): 95-7.
- 32.- Sobel J D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; 369 (9577): 1961-71.