

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

ESCUELA DE DOCTORADO

“STUDII SALAMANTINI”



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TESIS DOCTORAL

**Análisis del perfil de expresión de
microARN en pacientes con candidemia**

Silvio Ragozzino

2018

D. MIGUEL MARCOS MARTÍN. PROFESOR TITULAR. DEPARTAMENTO DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

D. HUGO GUILLERMO TERNAVASIO DE LA VEGA. PROFESOR ASOCIADO CIENCIAS DE LA SALUD. DEPARTAMENTO DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

DÑA. MARÍA INMACULADA GARCÍA GARCÍA. LICENCIADA ESPECIALISTA EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA. COMPLEJO ASISTENCIAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **“Análisis del perfil de expresión de microARN en pacientes con candidemia”** que presenta D. Silvio Ragozzino, ha sido realizado bajo su dirección, y reúne, a su juicio, originalidad y contenido suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca, a 16 de julio de 2018.

Fdo: M. Marcos

Fdo: H.G. Ternavasio

Fdo: M. I. García

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Hongos: aspectos microbiológicos generales	3
2. <i>Candida</i> spp.: espectro de manifestaciones clínicas	4
3. Candidemia	10
3.1. Definición y epidemiología	10
3.2. Factores de riesgo y manifestaciones clínicas	12
3.3. Magnitud e impacto de la candidemia	16
3.4. Principales avances en el manejo de la candidemia	18
3.4.1. Ámbito diagnóstico	18
3.4.2. Aspectos terapéuticos	21
3.5. Situación en España: estudios FUNGEMYCA y CANDIPOP	24
4. Concepto e importancia de los microARN	27
4.1. Biogénesis y mecanismo de acción de los miARN	30
4.2. Técnicas de medición de los miARN	33
5. Relevancia de los miARN en el ámbito de las enfermedades infecciosas	35
6. Justificación del trabajo	39
II. OBJETIVOS	41
III. MATERIAL Y MÉTODOS	45
1. Diseño del estudio	47
1.1. Tipo de estudio y selección de casos y controles	47
1.2. Definición de variables y recogida de datos	49
1.3. Métodos microbiológicos	53
2. Obtención de muestras sanguíneas y análisis de la expresión de miARN	54
2.1. Obtención y procesamiento de muestras	54
2.2. Análisis de miARN mediante secuenciación masiva	56
2.3. Análisis de expresión de miARN mediante qPCR con transcriptasa inversa	58
2.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa: aspectos generales	58
2.3.2. Síntesis de ADNc	61
2.3.3. Análisis de la estabilidad de expresión de los genes de referencia	62
2.3.4. Cuantificación relativa de miARN por qPCR	65
3. Análisis estadístico	68
3.1. Análisis del perfil de expresión de miARN mediante NGS	68
3.2. Análisis de resultados de la qPCR	68
3.3. Análisis de variables clínico-analíticas y correlación con la expresión de miARN	69
4. Aspectos éticos	69
5. Financiación	70

IV. RESULTADOS	71
1. Registro epidemiológico de los episodios de candidemia	73
2. Cohortes del estudio experimental	77
3. Análisis de la expresión de miARN mediante NGS	80
3.1. Comparación entre candidemia por <i>C. albicans</i> y controles	81
3.2. Comparación entre candidemia por <i>C. no albicans</i> y controles	82
3.3. Comparación entre candidemia por <i>C. albicans</i> y <i>C. no albicans</i>	83
4. Análisis de la expresión de miARN específicos mediante qPCR	84
4.1. Análisis de la expresión de miR-99b	84
4.2. Análisis de la expresión de miR-125a	86
4.3. Análisis de la expresión de miR-5690	87
4.4. Análisis de la expresión de miR-584	89
4.5. Análisis de la expresión de miR-144	90
4.6. Análisis de la expresión de let-7a	91
4.7. Análisis de la expresión de miR-223	92
4.8. Resumen de la expresión diferencial de miARN específicos	93
5. Correlación entre la expresión de miARN específicos y marcadores inflamatorios	94
5.1. Correlación entre miR-99b y marcadores inflamatorios	94
5.2. Correlación entre miR-125a y marcadores inflamatorios	97
5.3. Correlación entre miR-144 y marcadores inflamatorios	100
5.4. Resumen de la relación entre miARN y marcadores inflamatorios	102
6. Relación entre la expresión de miARN específicos y evolución clínica de los pacientes	104
6.1. Relación entre miR-99b y evolución clínica	104
6.2. Relación entre miR-125a y evolución clínica	106
6.3. Relación entre miR-144 y evolución clínica	107
V. DISCUSIÓN	109
1. Expresión diferencial de miARN en pacientes con candidemia	112
1.1. hsa-miR-99b-5p	114
1.2. hsa-miR-125a-5p	116
1.3. hsa-miR-144-5p	118
2. Relación con los marcadores inflamatorios	121
3. Relación con la evolución clínica	126
4. Consideraciones metodológicas y potenciales limitaciones	128
5. Aplicaciones clínicas	133
VI. CONCLUSIONES	139
VII. BIBLIOGRAFÍA	143
VIII. ANEXOS	165

I. INTRODUCCIÓN

1. Hongos: aspectos microbiológicos generales

Los hongos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos que se clasifican como eucariotas y heterótrofos (1). Existen aproximadamente 1,5 millones de especies diferentes, aunque sólo una muy pequeña proporción de ellas tiene potencial patógeno para la especie humana (1). Tienen una distribución universal, encontrándose en el suelo, en las plantas, o colonizando la superficie mucocutánea humana o de otras especies (2). A partir de la segunda mitad del siglo XX, las infecciones fúngicas han adquirido una importancia creciente debido a la generalización del empleo de los antibióticos (3).

Dada la enorme diversidad de estos microorganismos, la clasificación taxonómica es extremadamente compleja y está en continua evolución gracias a los extraordinarios progresos en las técnicas de secuenciación genética y de análisis filogenético. Sin embargo, una clasificación útil desde un punto de vista clínico, que considera aspectos estructurales y modalidad de crecimiento, es la que diferencia:

- hongos filamentosos o mohos: microorganismos multicelulares que crecen como cadenas filamentosas de células multinucleadas, denominadas hifas. Los miembros más importantes son las diferentes especies de *Aspergillus*;

- levaduras: microorganismos unicelulares que se reproducen fundamentalmente por gemación (1).

El principal género del grupo de las levaduras está representado por *Candida* spp. Se trata de células pequeñas con forma ovoidal, que miden 4-6 μm , y están dotadas de una pared delgada. Forman colonias lisas, de color blanco cremoso. Existen más de 150 especies de *Candida*, aunque sólo un pequeño porcentaje se consideran patógenas para el hombre. Son comensales habituales del ser humano y suelen aparecer en la piel, en el aparato digestivo, en el esputo, en el tracto genital femenino y en la orina de los pacientes portadores de sondas vesicales permanentes (4).

2. *Candida* spp.: espectro de manifestaciones clínicas

Estas levaduras forman parte de la microbiota normal en un elevado porcentaje de personas, sin embargo en ocasiones pueden producir manifestaciones clínicas que varían desde inocuas candidiasis superficiales hasta infecciones invasivas que llegan a comprometer la vida del paciente. Los principales factores de virulencia de estos gérmenes son: la habilidad de evadir los mecanismos de defensa del huésped, la capacidad de formar y adherirse a biopelículas, tanto en los tejidos del huésped como en dispositivos implantables y la producción de enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas y hemolisinas (5).

Las infecciones superficiales son relativamente frecuentes y en la mayoría de los casos se resuelven con un tratamiento tópico. Están relacionadas con alteraciones en la hidratación y cambios en el pH de mucosas y tejidos superficiales que se producen como consecuencia de situaciones fisiológicas, de otras enfermedades intercurrentes o de un tratamiento

antibiótico. Las formas más frecuentes son la candidiasis oro-faríngea, genital y cutánea (6).

Las infecciones invasivas por *Candida* tienen una gravedad sin duda mayor y se asocian a una alta tasa de mortalidad. En las últimas décadas, se ha observado un incremento progresivo en la incidencia de dichas infecciones, debido al considerable aumento de la población de riesgo (7): este incremento se ha producido sobre todo por el envejecimiento global de la población, así como por los notables progresos diagnóstico-terapéuticos que han transformado muchas enfermedades con pronóstico sombrío, especialmente en el campo oncológico, en enfermedades crónicas. La mayor difusión y disponibilidad de procedimientos invasivos así como la generalización en el empleo de antibióticos de amplio espectro han favorecido el aumento de la carga de morbilidad producida por estos gérmenes. Actualmente se calcula que la candidiasis invasiva afecta al menos a 250000 personas en el mundo cada año y es responsable de más de 50000 muertes (7). Es la infección fúngica más frecuente entre pacientes hospitalizados en el mundo desarrollado. Según el registro norteamericano PATH (del inglés, *Prospective Antifungal Therapy Alliance*), más del 70% de las infecciones fúngicas invasivas están causadas por *Candida* spp. (8). Antes de adentrarnos en la clasificación y descripción de las distintas presentaciones clínicas, cabe destacar que, junto a los mencionados factores de riesgo, algunos estudios sugieren la existencia de factores genéticos de susceptibilidad a la infección invasiva por *Candida*: se han reconocido, de hecho, polimorfismos en citoquinas pro- y anti-inflamatorias y en genes implicados en la vía de señalización del *Toll-Like Receptor* (TLR) 1

– interferón gamma que parecen asociarse a una mayor susceptibilidad y a la progresión de la infección fúngica (7).

La candidiasis invasiva puede llegar a afectar prácticamente cualquier órgano o aparato del cuerpo humano, según dos modalidades principales de diseminación: por vía hematógena o por inoculación directa en un órgano o cavidad normalmente estéril (9). La candidemia, es decir la presencia del microorganismo en el torrente sanguíneo, es probablemente la expresión clínica más importante y, sin lugar a duda, la más estudiada. En los siguientes párrafos, analizaremos con mayor detalle los principales aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos de la candidemia. Aquí, presentamos brevemente las otras formas clínicamente relevantes:

- Candidiasis peritoneal: *Candida* es una causa frecuente de peritonitis terciaria posquirúrgica, aislándose en el 4-32% de los casos de peritonitis nosocomial en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), aunque en la mayoría de las ocasiones la etiología es polimicrobiana (10). En todo caso, el aislamiento de *Candida* spp. en el líquido peritoneal se asocia claramente con un peor pronóstico. Los principales factores de riesgo descritos para el desarrollo de candidiasis peritoneal, son la perforación del tracto digestivo alto, la dehiscencia de una anastomosis gastrointestinal y la pancreatitis necrohemorrágica. Se ha descrito también una alta incidencia de esta complicación entre pacientes sometidos a trasplante de páncreas (10).

- Candidiasis ocular: puede producir coriorretinitis o endoftalmitis (coriorretinitis con vitritis). Cursa generalmente de forma

asintomática o con síntomas leves como visión borrosa, pero en algunos casos se asocia a manifestaciones graves que, sin tratamiento, progresan a necrosis retiniana y desprendimiento de retina con consecuencias devastadoras sobre la agudeza visual (11). En los casos más graves, puede ser necesaria una vitrectomía parcial o la administración intravítrea de antifúngicos (10).

- Endocarditis por *Candida*: es una de las manifestaciones más graves. Puede afectar a las estructuras valvulares o a dispositivos intracardíacos. Es generalmente consecuencia de una candidemia y se observa con mayor frecuencia en pacientes con válvulas protésicas, usuarios de drogas por vía parenteral o en enfermos con un catéter venoso central y candidemia persistente (10). Las manifestaciones clínicas son las clásicas: fiebre, aparición de un soplo cardíaco nuevo o cambio de uno preexistente, signos y síntomas de insuficiencia cardíaca y complicaciones embólicas (12). Estas últimas son más frecuentes en la endocarditis por *Candida* respecto a la endocarditis bacteriana, probablemente debido al mayor tamaño de las vegetaciones fúngicas (10). En la mayoría de los casos, se requiere cirugía de sustitución o recambio valvular (12).

- Candidiasis del tracto urinario: la candiduria es frecuente en los pacientes hospitalizados y en la mayoría de los casos refleja una colonización del tracto urinario. Sin embargo, en ocasiones, puede ser consecuencia de una afectación renal, ya sea por diseminación hematogena, en el contexto de una candidiasis diseminada, o por vía

ascendente, sobre todo cuando existe obstrucción del tracto urinario (13). En el primer caso, se pueden detectar múltiples microabscesos bilaterales, mientras que la infección ascendente suele desarrollarse de manera más insidiosa y con afectación generalmente unilateral. Ocasionalmente, puede complicarse con el desarrollo de bolas fúngicas urinarias (10).

- Candidiasis osteoarticular: la infección osteoarticular por *Candida* puede producirse por diseminación hematológica, inoculación tras un traumatismo o un procedimiento quirúrgico, inyección intraarticular de fármacos o uso de drogas por vía parenteral. Las manifestaciones clínicas son las clásicas, principalmente dolor y limitación funcional, sin embargo los síntomas suelen ser más leves respecto a las infecciones de etiología bacteriana, lo que conduce frecuentemente a un retraso diagnóstico (14). La osteomielitis por *Candida* se localiza más a menudo en la columna vertebral en adultos y en huesos largos en niños. Una forma peculiar de osteomielitis por *Candida* es la esternal, que puede desarrollarse en pacientes sometidos a esternotomía. Requiere generalmente desbridamiento quirúrgico y tratamiento prolongado (10). La afectación articular puede desarrollarse en articulaciones nativas o protésicas. Generalmente será necesario realizar drenaje y, siempre que sea posible, retirar la prótesis articular (14).

- Candidiasis del sistema nervioso central: puede ser una consecuencia de procedimientos neuroquirúrgicos, llegando a

representar el 5% de las meningitis adquiridas tras neurocirugía. Más raramente puede ser la expresión de candidiasis diseminadas o una infección crónica aislada. Clínicamente cursa con la tríada clásica: fiebre, rigidez de nuca y alteración del estado mental. El tratamiento es generalmente combinado: quirúrgico, que consiste en la retirada de material extraño, eventualmente presente, como una derivación ventricular, junto con terapia antifúngica sistémica (10).

- Candidiasis crónica diseminada: hace referencia a la candidiasis hepatoesplénica que aparece, casi exclusivamente en el paciente oncohematológico, tras la recuperación de un periodo de neutropenia: característicamente, en las pruebas de imagen, se detectan lesiones típicas “en ojo de buey” (10). En cierto sentido, la candidiasis crónica diseminada puede considerarse un síndrome de reconstitución inmune. De hecho, algunas evidencias sugieren que el uso de corticoides sistémicos, asociado a un tratamiento antifúngico prolongado, mejora el pronóstico (15).

3. Candidemia

3.1. Definición y epidemiología

La candidemia se define como la presencia de *Candida* spp. en la sangre demostrada en al menos un hemocultivo (16). La principal fuente de infección es la vía endógena, ya que, como se ha indicado previamente, distintas especies de *Candida* pueden colonizar la piel y las mucosas de los pacientes. Uno de los mecanismos más frecuentes de paso del hongo a la circulación sanguínea es la translocación a través del epitelio intestinal. La infección también puede transmitirse por vía exógena, a través de material infectado, personal sanitario o desde otros pacientes (17). La expresión clínica de la candidemia es muy variable ya que oscila desde síntomas leves hasta una situación de shock séptico y provoca una carga de morbilidad y mortalidad notable sobre todo en los pacientes hospitalizados. Su incidencia se estima en 72,8 casos por millón de habitantes y por año y ha aumentado sensiblemente en las últimas décadas (17), seguramente, al menos en parte, por los progresos importantes alcanzados en el campo sanitario. Aunque se describen más de 100 especies de *Candida*, el registro internacional ARTEMIS DISK indica que el 92% de los episodios de candidemia está producido por tan sólo 5 especies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, y *C. krusei* (18). No obstante, la epidemiología de la candidemia está en continua evolución. En las últimas décadas, se han observado cambios significativos que son el resultado de la modificación de las situaciones predisponentes y de la población de riesgo, del patrón de empleo de los antifúngicos y de la presión selectiva ejercida por estos últimos (19). De esta forma, en el último periodo se ha observado un progresivo aumento de las especies de *Candida* no *albicans*:

C. albicans sigue siendo el patógeno más importante, pero las otras especies de *Candida* en conjunto causan actualmente más de la mitad de los episodios de candidemia (20). Además, van cobrando importancia creciente especies menos comunes tales como *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr* y *C. famata*. Un estudio reciente (21), realizado en pacientes oncohematológicos demuestra una incidencia casi doble de estas especies en los últimos años que se asocia además con altas tasas de resistencia a antifúngicos, con candidemia de brecha y mayor riesgo de mortalidad. Por otro lado, se han definido nuevas especies dentro de las ya descritas y conocidas: es el caso de *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*, que forman parte del complejo *C. parapsilosis* (22), y *C. nivariensis* y *C. bracarensis* que se incluyen dentro del grupo *C. glabrata* (23). Son las denominadas especies crípticas, indistinguibles desde el punto de vista fenotípico, pero genéticamente diferentes y que han podido discriminarse gracias a las nuevas técnicas de análisis disponibles. Una especie emergente responsable de una reciente alerta sanitaria internacional es *C. auris*. Este patógeno, descrito por primera vez en Japón en 2009 (24), tiene gran interés epidemiológico por su alta transmisibilidad, que le ha permitido causar brotes en unidades hospitalarias en España y Reino Unido (25). Además, estudios preliminares demuestran una alta tasa de resistencia a fluconazol, junto con la descripción de cepas multirresistentes (26). La difusión del empleo de agentes antifúngicos podría ser el principal determinante de la emergencia de este germen. Por todas las razones expuestas, merece la pena llevar a cabo periódicamente estudios locales de vigilancia epidemiológica, junto con el análisis de la evolución de la tasa de resistencia de los

microorganismos emergentes y programas de uso racional de antimicrobianos (27).

También la distribución geográfica de las especies de *Candida* es variable: *C. albicans* sigue siendo la especie más frecuente de manera uniforme; sin embargo se observa un patrón de distribución singular que afecta principalmente a *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. *C. parapsilosis* es la segunda especie en prevalencia en la parte meridional de Europa, incluyendo a España, y en América Central y del Sur. Es mucho menos frecuente en Europa del Norte y en Estados Unidos donde *C. glabrata* se coloca en segundo lugar (28). La razón de esta peculiar distribución geográfica no es conocida; entre las hipótesis se consideran las diferencias climáticas, el distinto patrón de uso de los antifúngicos y los cuidados del catéter venoso central (28).

La especie de *Candida* responsable de la candidemia se ve influenciada también por la edad del paciente. Así, *C. albicans* y *C. parapsilosis* son más frecuentes en neonatos, la incidencia de *C. parapsilosis* disminuye con la edad, mientras que *C. glabrata* es más frecuente en el paciente anciano (28).

3.2. Factores de riesgo y manifestaciones clínicas

Como se ha dicho previamente, la incidencia de la candidemia ha aumentado notablemente en las últimas décadas, debido a la supervivencia prolongada de pacientes con enfermedades graves, a la expansión de las indicaciones quirúrgicas, a la utilización cada vez más frecuente de procedimientos diagnóstico-terapéuticos invasivos y al empleo generalizado de

antibioterapia de amplio espectro. En esta sección examinaremos en detalle los factores de riesgo asociados al desarrollo de la candidemia.

Los dos grandes grupos de riesgo son los pacientes críticos no neutropénicos y los enfermos con neutropenia mantenida, ya sea por su enfermedad oncohematológica de base o por el tratamiento quimioterápico recibido (29). La patogenia es distinta entre los dos grupos: en los pacientes neutropénicos, la candidemia generalmente se desarrolla por invasión directa desde la luz intestinal por la propia neutropenia o por el daño producido en forma de mucositis por el tratamiento citotóxico. En los enfermos no neutropénicos, por otro lado, inciden dos factores principales: la colonización de piel y mucosas como consecuencia de un tratamiento antibiótico prolongado de amplio espectro y la alteración de la integridad de las barreras naturales como resultado de cirugía, heridas, quemaduras, inserción de catéteres vasculares o de sonda urinaria. Por lo tanto, las principales puertas de entrada para las infecciones invasivas por *Candida* spp. resultan ser el tubo digestivo, la piel y el tracto genitourinario (30).

Son muchos los factores de riesgo que se han descrito en asociación a las infecciones fúngicas invasivas y existe gran interés científico alrededor de dichos factores predisponentes para el desarrollo de modelos predictivos (31, 32). De forma esquemática, los más relevantes son los siguientes:

- Colonización previa por *Candida* spp.: hasta un 60-80% de los pacientes con candidemia presentan colonización por la misma especie. La intensidad de la colonización, es decir la presencia de colonización en múltiples localizaciones, a su vez, representa un factor de riesgo independiente para el

desarrollo de la candidemia. El riesgo de infección invasiva aumenta dependiendo del lugar de colonización, siendo más alto en caso de candidiasis urinaria o rectal (33).

- Estancia prolongada (> 3 días) en UCI: está a su vez relacionada con otros importantes factores de riesgo. De hecho, los pacientes en UCI tienen un mayor riesgo de colonización multifocal por *Candida* spp., una mayor exposición a antibioterapia de amplio espectro y más frecuentemente presentan alteración de la barrera mucocutánea secundaria a procedimientos invasivos o a la presencia de dispositivos intravasculares (34).

- Gravedad de la enfermedad de base: la gravedad clínica medida con escalas como el *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE) II y el *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) se ha visto relacionada en distintos estudios con un mayor riesgo de candidemia (35, 36). Además, se ha descrito también una asociación con infección por especies resistentes a fluconazol (37).

- Empleo de antibioterapia de amplio espectro: altera la flora microbiana saprofita y favorece el sobrecrecimiento de especies fúngicas. El riesgo aumenta con el número de antibióticos empleados y con la duración más prolongada del tratamiento (34). En algunos estudios se ha demostrado que las cefalosporinas y los antibióticos con actividad frente a anaerobios son los que están más asociados con el riesgo de infección fúngica invasiva (38).

- Presencia de dispositivos intravasculares: los catéteres venosos centrales, concretamente, representan la fuente de infección en el 35-80% de

los casos (39). La duración del catéter tiene relación lineal con el riesgo infeccioso (40).

- Nutrición parenteral: la infusión parenteral de preparados nutricionales, especialmente las soluciones lipídicas, se asocia con un aumento de la proliferación de las levaduras y del riesgo de candidemia (41).

- Antecedentes quirúrgicos y otros procedimientos invasivos: los pacientes sometidos a cirugía abdominal, especialmente cirugía digestiva alta, son una población de alto riesgo para el desarrollo de candidiasis invasiva (42, 43). El mecanismo es multifactorial e incluye: la agresión directa que conlleva el procedimiento quirúrgico con alteración de la integridad de la barrera cutáneo-mucosa, la profilaxis o el tratamiento antibiótico que aumenta el riesgo de colonización fúngica y las alteraciones de la mucosa intestinal generadas por la falta de dieta enteral que predisponen a la translocación fúngica. Las situaciones de mayor riesgo son las cirugías complicadas, la peritonitis terciaria, la perforación del tracto digestivo alto y la pancreatitis grave (42).

- La situación inmunológica: algunas enfermedades de base como las oncológicas y oncohematológicas, la diabetes mellitus y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, así como el tratamiento corticoideo e inmunosupresor, la neutropenia y la inmunosenescencia, pueden aumentar el riesgo de infección fúngica invasiva (7, 44).

Existen muchos otros factores de riesgo descritos en distintos estudios (38, 45), la mayoría de ellos relacionados con la gravedad clínica y con la estancia en Unidades de Cuidados Intensivos. Estos son, entre otros, las

técnicas de reemplazo renal, la ventilación mecánica invasiva y las transfusiones de componentes hemáticos.

El conocimiento cada vez más detallado de las condiciones que favorecen el desarrollo de la candidemia, ha permitido elaborar en los últimos años, varias escalas predictoras. Entre las más empleadas están el *Candida score* (31), el índice de Pittet (46) y la escala de Ostrosky-Zeichner (32). Dichas escalas agrupan factores de riesgo, estado de colonización y datos clínicos, permitiendo de esta forma una aproximación al diagnóstico. Desde un punto de vista práctico, con la ayuda de estos *scores* es posible estratificar a los pacientes según el riesgo de candidiasis invasiva e identificar aquellos que se beneficiarían de un tratamiento antifúngico precoz.

3.3. Magnitud e impacto de la candidemia

Actualmente el impacto de la candidemia y de las otras infecciones fúngicas invasivas sobre la salud pública es bastante bien conocido y hay muchos trabajos epidemiológicos nacionales (20, 47) e internacionales (16, 19) que lo certifican. En conjunto, las especies de *Candida* representan casi el 80% de todos los hongos patógenos causantes de infecciones nosocomiales (39). Concretamente, la candidemia es la infección fúngica invasiva más frecuente en el paciente crítico (48). *Candida* se coloca en cuarto lugar en orden de frecuencia entre los patógenos responsables de bacteriemias nosocomiales, en tercer lugar si consideramos únicamente el contexto de los Cuidados Intensivos (49, 50). La candidemia conlleva un cargo considerable de morbilidad y mortalidad. Aunque la gravedad de las enfermedades subyacentes a menudo

dificulta la correcta evaluación de la mortalidad atribuible, podemos decir que el desarrollo de candidemia es un factor pronóstico independiente de muerte (51). Los pacientes con candidemia presentan el doble de riesgo de morir respecto a los que padecen una infección nosocomial bacteriana (51). La mortalidad global asociada con la candidemia varía ostensiblemente en las diferentes poblaciones de estudio, pudiendo llegar a superar en algunos contextos el 60% de los casos (46, 50). Sin embargo en la mayoría de las series la tasa de mortalidad se encuentra en un rango comprendido entre el 27 y el 38% (30). Además, la candidemia tiene un impacto económico significativo. Este aspecto está relacionado con estancias más prolongadas en Unidades de Cuidados Intensivos, con el coste de los fármacos antifúngicos y con la estancia hospitalaria global (39, 52, 53). Un trabajo estadounidense, basado en datos procedentes de la muestra nacional de pacientes hospitalizados del año 2000 (NIS 2000, del inglés *Nationwide Inpatient Sample 2000*), ha calculado, por cada paciente adulto que desarrolla candidemia, un incremento medio de 10 días de hospitalización con un correspondiente aumento en los gastos sanitarios de casi 40000 dólares (53).

3.4. Principales avances en el manejo de la candidemia

En este apartado, se realiza una breve reseña sobre los principales avances registrados en las últimas décadas en el diagnóstico y tratamiento de la candidemia.

3.4.1. Ámbito diagnóstico

El método de referencia para el diagnóstico de la candidemia sigue siendo el crecimiento de *Candida* spp. en hemocultivos. Sin embargo la sensibilidad de esta técnica microbiológica convencional oscila entre el 50 y el 75% (54). Por lo tanto, en los últimos años, la investigación se ha centrado en el desarrollo de nuevas técnicas o biomarcadores que mejoran la sensibilidad y el tiempo de respuesta en el diagnóstico de la infección fúngica invasiva. Las técnicas alternativas se centran, entre otras, en la detección de componentes no antigénicos, antígenos, anticuerpos, proteínas y ADN fúngico.

- Determinación del beta-glucano (1-3-β-D-glucano) en suero (55): se trata de un marcador panfúngico, es decir que está expresado en la membrana celular de la mayoría de las especies fúngicas, con la excepción de criptococos y mucorales. En este sentido, no permite discriminar la etiología de una infección fúngica invasiva, pero puede tener cierta utilidad, por ejemplo, en la decisión de un tratamiento anticipado en caso de sospecha de candidemia. Uno de los principales problemas relacionados con este marcador, es su baja especificidad: hay muchas situaciones que pueden provocar falsos positivos como la transfusión de hemoderivados, la bacteriemia, el empleo de beta-

lactámicos y los filtros de diálisis. El beta-glucano está presente en el ambiente por lo que el riesgo de contaminación es muy elevado.

- Detección del manano-antimanano y de los anticuerpos anti-micelio (56): el manano es un antígeno presente en la pared fúngica que circula en la sangre en caso de candidiasis invasiva. Su rentabilidad diagnóstica mejora cuando su determinación se asocia con la detección de anticuerpos específicos anti-manano. Los anticuerpos anti-micelio, por otro lado, son anticuerpos dirigidos frente al tubo germinal de *C. albicans*. La ventaja principal es que permiten discriminar entre infección y colonización y son útiles sobre todo en caso de localizaciones profundas. La determinación se realiza con técnica de inmunofluorescencia y, aunque en principio los anticuerpos anti-micelio son específicos de *C. albicans*, algunos estudios sugieren su utilidad también en otras especies de *Candida*.

- *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) (30, 57): es una técnica basada en la espectrometría de masas, válida tanto para la detección como para la identificación rápida de las diferentes especies de *Candida* (incluidas las especies crípticas) a partir de cultivo clínico (10-15 minutos, respecto a las 24 horas o más de las técnicas convencionales). Esta reducción de tiempo es fundamental ya que la identificación de la especie permite prever el espectro de sensibilidad a azoles y de esta manera dirigir la elección del antifúngico antes de disponer del estudio de sensibilidad.

- *Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization* (PNA-FISH) (30, 57): es una técnica de identificación que se realiza directamente sobre una

muestra positiva, sin precisar el crecimiento de colonias fúngicas. Los *kit* disponibles en el mercado son multi-especies, en el sentido que un resultado positivo permite restringir el diagnóstico a 1 o 2 especies (*C. albicans/tropicalis* vs. *C. glabrata/krusei* vs. *C. parapsilosis*). Como en el caso del MALDI-TOF, permite una identificación más rápida de la especie.

- T2 *Magnetic Resonance Candida Assay* (T2MR) (30, 57): es un ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa, que utiliza la resonancia magnética para identificar la presencia de *Candida* en muestras de sangre periférica. Tras procesar la muestra, los resultados están disponibles en 3-4 horas. Ofrece información relativa a la especie fúngica por pareja de especies, de forma similar a la PNA-FISH. Presenta un valor predictivo positivo superior al 90% y un valor predictivo negativo cercano al 100%, sin embargo los datos procedentes de la práctica clínica son aún muy escasos.

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) (57): las técnicas moleculares de detección de ácidos nucleicos, basadas en la PCR, aumentan notablemente la sensibilidad con respecto al cultivo tradicional. Según un metaanálisis reciente (58), la sensibilidad y especificidad de estos métodos son del 95 y 92%, respectivamente.

En definitiva, en los últimos años ha habido avances notables en el estudio de nuevos biomarcadores y en el desarrollo de técnicas diagnósticas innovadoras, sin embargo la falta de estandarización, el hecho de que no están universalmente disponibles y los costes elevados limitan actualmente su empleo. Esto hace que los hemocultivos, con las limitaciones detalladas arriba,

sigan representando la técnica diagnóstica de referencia en el campo de las candidemias.

3.4.2. Aspectos terapéuticos

El arsenal terapéutico se ha ampliado significativamente en el último periodo. Durante muchos años, la amfotericina B y la flucitosina han sido los únicos antifúngicos disponibles para el tratamiento de la candidiasis invasiva (59). En las últimas décadas, se han comercializado nuevos fármacos pertenecientes a dos familias principales, los derivados imidazólicos y las equinocandinas (figura 1). Además se han desarrollado formulaciones lipídicas de la amfotericina B, permitiendo reducir significativamente la toxicidad de este compuesto.

El fluconazol ha representado el antifúngico de elección a partir de los años 90 (60): la difusión de su empleo, sobre todo en la profilaxis de los pacientes oncohematológicos ha tenido un importante impacto ecológico, con el aumento de la prevalencia de las especies de *Candida* no *albicans* y, concretamente, de las que muestran una sensibilidad reducida a los azoles (59).

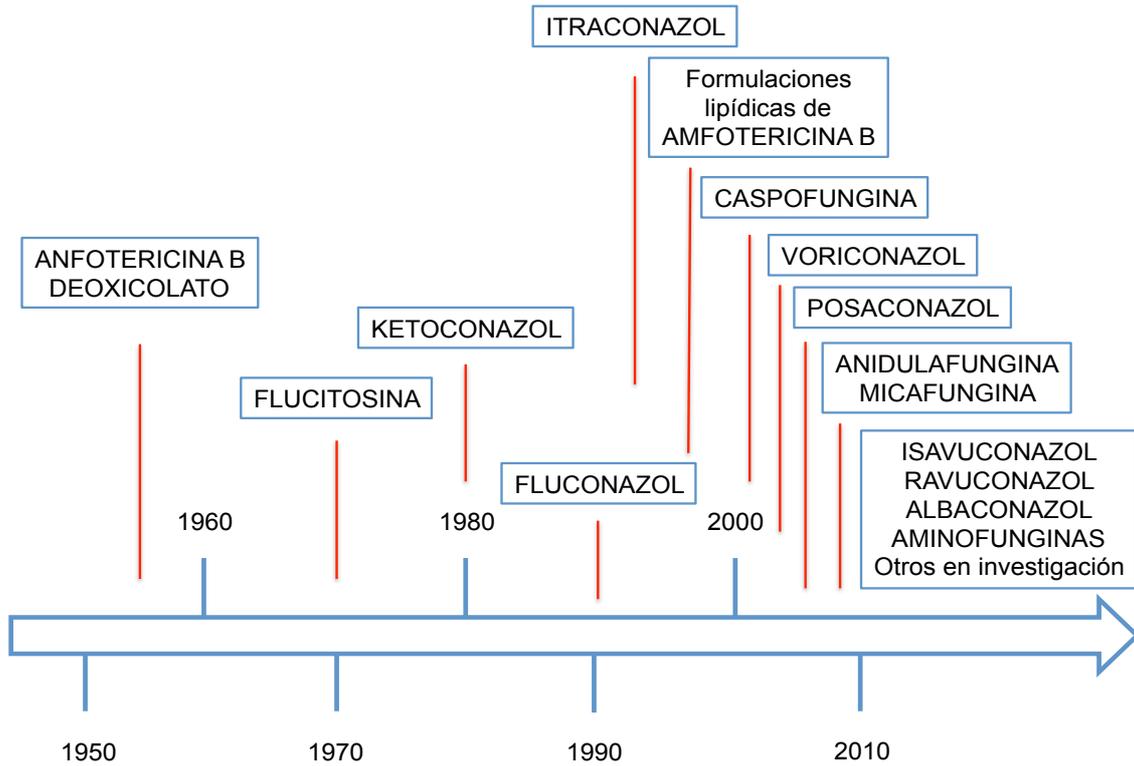


Figura 1. Evolución histórica de los antifúngicos.

La introducción de las equinocandinas a partir del principio de este siglo ha supuesto un avance importante en el tratamiento de la infección fúngica: actualmente se dispone de tres moléculas, caspofungina, anidulafungina y micafungina, con eficacia probada frente a especies resistentes a azoles junto con un excelente perfil de tolerabilidad (59). Por eso, las principales guías de tratamiento recientemente publicadas (61, 62), recomiendan el empleo de las equinocandinas respecto al fluconazol, sobre todo en el contexto del paciente crítico y en presencia de exposición previa a azoles. No obstante, debido a la escasez de evidencia científica, el debate sobre el agente antifúngico de elección en los distintos escenarios está todavía abierto (59). En la tabla 1 se analizan las principales propiedades del fluconazol y de las equinocandinas.

Tabla 1. Comparación de las características principales de las equinocandinas y de fluconazol.

Equinocandinas	Fluconazol
Actividad fungicida	Actividad fungistática
Activas frente a biopelículas	Inactivo
Concentración dependiente	Tiempo dependiente
Espectro amplio - CMI más alta para <i>C. parapsilosis</i>	Espectro más limitado - especies con sensibilidad disminuida, <i>C. glabrata</i> y <i>C. krusei</i>
Sólo formulaciones intravenosas	Excelente biodisponibilidad oral
Baja penetración en LCR y tejido ocular Escasa eliminación urinaria	Distribución amplia, incluyendo LCR y tejido ocular Eliminación urinaria (70-80%)
De elección en paciente crítico y en caso de exposición previa a azoles	Útil en meningitis, endoftalmitis o ITU y en terapia secuencial
Excelente perfil de tolerabilidad	Buen perfil de tolerabilidad - Elevación transaminasas - Prolongación del intervalo QT
Escasas interacciones farmacológicas	Inhibe el citocromo CYP450

Pese a los avances en el campo farmacológico, la resistencia al tratamiento antifúngico sigue siendo un tema de gran importancia. De hecho, en los últimos años, se ha ido describiendo la aparición de resistencia a las equinocandinas, sobre todo entre las cepas de *C. glabrata*. Dicha resistencia está mediada por la aparición de mutaciones puntuales, tras la exposición a equinocandinas, en los genes FKS1 y FKS2 que codifican por la 1-3-β-D-glucano-sintetasa (63). Esta enzima está implicada en la síntesis de la pared fúngica y es la diana de las equinocandinas.

Se están desarrollando y evaluando por tanto nuevos antifúngicos: entre los derivados imidazólicos, destaca el isavuconazol, recientemente introducido en el mercado, que es activo frente a especies resistentes a fluconazol. Está disponible en formulación oral y tiene un mejor perfil de tolerabilidad respecto al voriconazol (64). Por otro lado, recientemente se han publicado los resultados de los ensayos de fase I relativos a una nueva equinocandina, rezafungina (CD101 por su nombre en los ensayos clínicos), con gran eficacia *in vitro* e *in vivo* frente a especies resistentes y con propiedades farmacocinéticas de interés, como una vida media prolongada que permitiría la administración semanal del fármaco (65). Por último, se encuentran en fase de desarrollo también vacunas antifúngicas, estrategia preventiva que podría ser útil especialmente entre las poblaciones con riesgo de recurrencia de infección fúngica invasiva, como los pacientes inmunodeprimidos (64).

3.5. Situación en España: estudios FUNGEMYCA y CANDIPOP

La epidemiología de las infecciones fúngicas invasivas en España ha sido recientemente actualizada gracias a dos estudios prospectivos realizados en los últimos años. El trabajo del grupo “FUNGEMYCA” (Estudio Epidemiológico sobre la Etiología de las Fungemias en España y de la Sensibilidad *in vitro* de los Aislados Clínicos), publicado en 2011, es un estudio multicéntrico realizado en 44 hospitales españoles durante un periodo de 13 meses (23). Se detectaron 1357 episodios de fungemia, con una incidencia global de 0,92 episodios/1000 ingresos/año. El dato probablemente más destacable es que aproximadamente el 65% de los episodios de fungemia se

registraron en pacientes ingresados en plantas convencionales. En otras palabras, la candidemia no es un problema exclusivamente de los pacientes críticos, sino que representa una realidad también fuera de las Unidades de Cuidados Intensivos. Los ancianos son los más frecuentemente afectados, con casi la mitad de los casos que se desarrollan en pacientes mayores de 64 años. *C. albicans* sigue siendo la especie más frecuentemente aislada (45%), aunque en conjunto las otras especies de *Candida* son más prevalentes, confirmando la tendencia observada en otras series en las últimas décadas (16, 19, 66). *C. parapsilosis* es la segunda especie en frecuencia (27%), sin embargo es la más prevalente en niños, en el rango de edad entre 1 mes y 15 años. En cuanto a la sensibilidad antifúngica, los datos de este estudio muestran una tasa de resistencia a fluconazol alrededor del 8%.

El estudio poblacional prospectivo sobre candidemia en España “CANDIPOP” se ha llevado a cabo en los hospitales de 5 de las áreas metropolitanas más grandes de España: Barcelona, Bilbao, Madrid, Sevilla y Valencia (67). Es el primer estudio en España que ha analizado la candidemia en una población tan grande, más de 9 millones de habitantes y alrededor de un quinto de la población española total. En un periodo de 12 meses, se identificaron más de 700 episodios de candidemia, permitiendo estimar una incidencia de 8,1 casos/100000 habitantes/año. Esta cifra concuerda con estudios poblacionales realizados en Estados Unidos y otros países europeos (19, 68), sin embargo muestra que la incidencia en España se ha duplicado en la última década (69). Los datos relativos a la distribución de las especies son superponibles a los de FUNGEMYCA, detallados previamente. Sin embargo, llama la atención que en el estudio CANDIPOP menos del 80% de las cepas

aisladas mostrara sensibilidad a fluconazol. Este dato alarmante contrasta con los resultados de FUNGEMYCA y está probablemente en relación con la mayor frecuencia de especies con sensibilidad intrínsecamente disminuida a fluconazol, como *C. glabrata*. Por otro lado, también se ha detectado un significativo aumento de la resistencia a fluconazol entre las cepas de *C. tropicalis* (22%). Estos resultados, en conjunto, resaltan una vez más la importancia de la vigilancia periódica de la epidemiología de este tipo de infección y la utilidad del estudio de sensibilidad. En el estudio CANDIPOP, además, se encontró una tasa de mortalidad a los 30 días próxima al 31%. Se observa un discreto descenso respecto a estudios nacionales previos (20, 47), pero sigue siendo un dato estremecedor: casi uno de cada 3 pacientes con candidemia fallece tras desarrollar la infección. Este estudio también analizó los factores asociados a mortalidad precoz, definida como la que acontece en los primeros 7 días tras el desarrollo de la candidemia, y aquellos relacionados con mortalidad tardía (entre los 7 y 30 días de seguimiento). El dato que emerge es que las intervenciones como el tratamiento antifúngico precoz y la retirada del catéter venoso central, tienen impacto principalmente sobre la mortalidad precoz, mientras que en la mortalidad tardía influyen mayormente las características del paciente (edad, comorbilidad y situación de inmunodepresión) y la gravedad de la presentación clínica de la candidemia (sepsis, shock séptico).

4. Concepto e importancia de los microARN

La clasificación de los ácidos ribonucleicos (ARN), en las primeras fases de desarrollo de la biología molecular, reconocía una clase de ARN codificante de proteínas o ARN mensajero (ARNm) y un ARN no codificante con funciones específicas: el ARN de transferencia (ARNt) y el ARN ribosomal (ARNr). Sin embargo, las regiones génicas que codifican proteínas representan solo el 2% del genoma humano (70). Hasta hace relativamente poco, se pensaba que gran parte del resto del ácido desoxirribonucleico (ADN) humano no era útil o, en otras palabras, que era “genoma basura” (71). Pero en las últimas décadas, se han llegado a conocer un gran número de grupos de ARN no codificantes, cuya caracterización y funciones son objeto de intenso estudio y de un número creciente de publicaciones. En la figura 2 podemos ver los principales grupos de ARN no codificantes actualmente conocidos. Entre ellos están los microARN (miARN), que son objeto de este trabajo. Su función fundamental es regular la expresión génica de su ARNm diana mediante mecanismos post-transcripcionales (72).

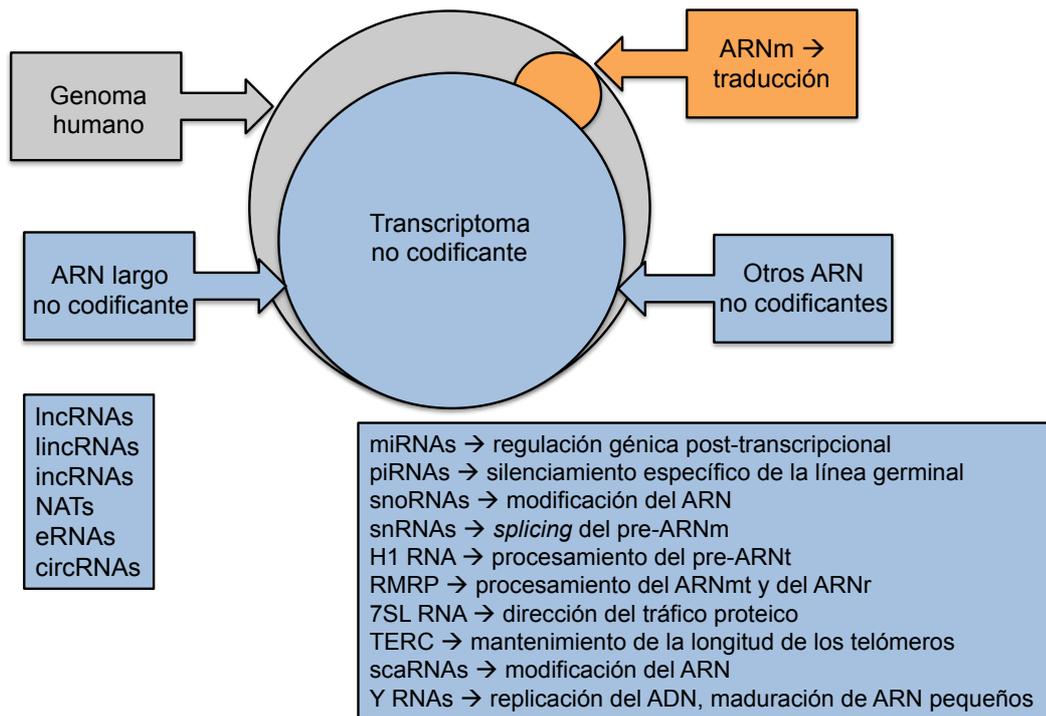


Figura 2. ARN no codificante del transcriptoma humano (adaptado de Boon *et al.* JACC 2016).

ARNm: ARN mensajero; lncRNAs: *long non-coding RNAs*; lincRNAs: *long intervening non-coding RNAs*; incRNAs: *intronic long non-coding RNAs*; NATs: *natural antisense transcripts*; eRNAs: *enhancer RNAs*; circRNAs: *circular RNAs*; miRNAs: *microRNAs*; piRNAs: *piwi-interacting RNAs*; snoRNAs: *small nucleolar RNAs*; snRNAs: *small nuclear RNAs*; H1 RNA: *RNA component of ribonuclease P*; pre-ARNt: precursor del ARN de transferencia; RMRP: *RNA component of the RNase MRP*; ARNmt: ARN mitocondrial; ARNr: ARN ribosomal; 7SL RNA: *signal recognition particle RNA*; TERC: *telomerase RNA component*; scaRNAs: *small Cajal body specific RNAs*; Y RNAs: parte de la ribonucleoproteína Ro.

La historia de los miARN empieza al principio de la década de los 90, con el descubrimiento del primer miARN, Lin-4, en *Caenorhabditis elegans* (73). A partir de entonces han sido descritos cientos de miARN en distintas especies. Actualmente en humanos se conocen más de 2000 secuencias de miARN (74) que regulan un gran porcentaje de todos los genes humanos.

En 2002 se obtuvieron además las primeras evidencias de un papel de los miARN en las enfermedades humanas: Calin *et al.* (75) demostraron que la pérdida de los miARN miR-15 y miR-16 se asociaba con la aparición de la leucemia linfática crónica. Aparte de su papel fisiopatológico, que, como veremos, confiere a estas moléculas un importante rol como diana potencial de innovadores agentes terapéuticos, los miARN se pueden detectar en sangre periférica de los pacientes, por lo que son potencialmente útiles como marcadores diagnósticos y pronósticos de distintas enfermedades. En este sentido, el análisis mediante *microarray* y las técnicas de secuenciación masiva han permitido correlacionar la expresión de estas moléculas con distintos grupos de enfermedades, cardiovasculares, autoinmunes, tumorales e infecciosas (76). La figura 3 muestra la evolución de los avances registrados en este campo en las últimas décadas.

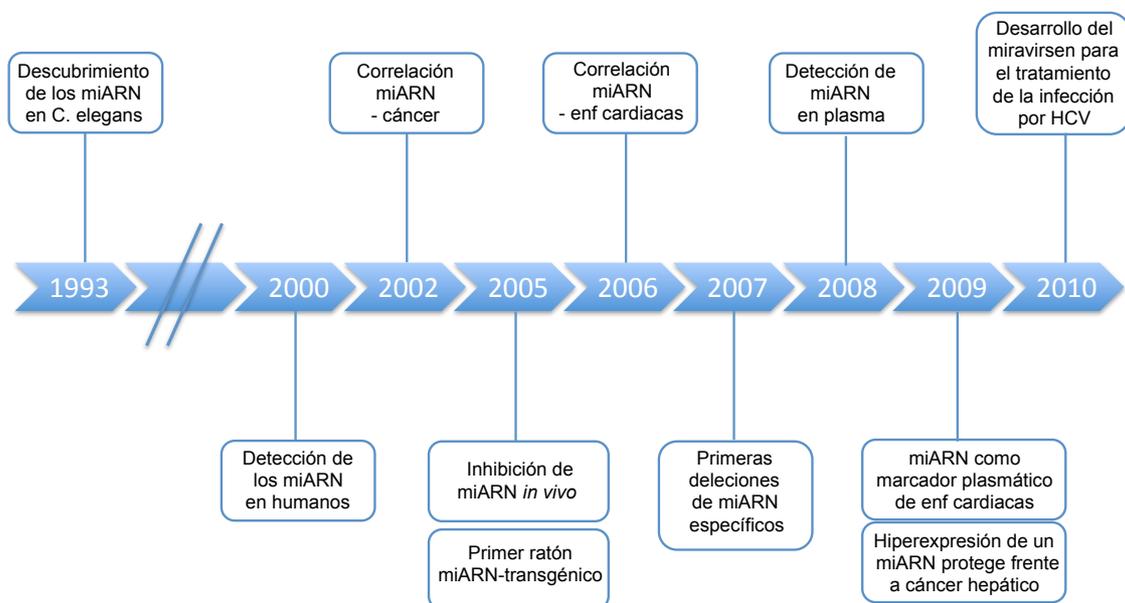
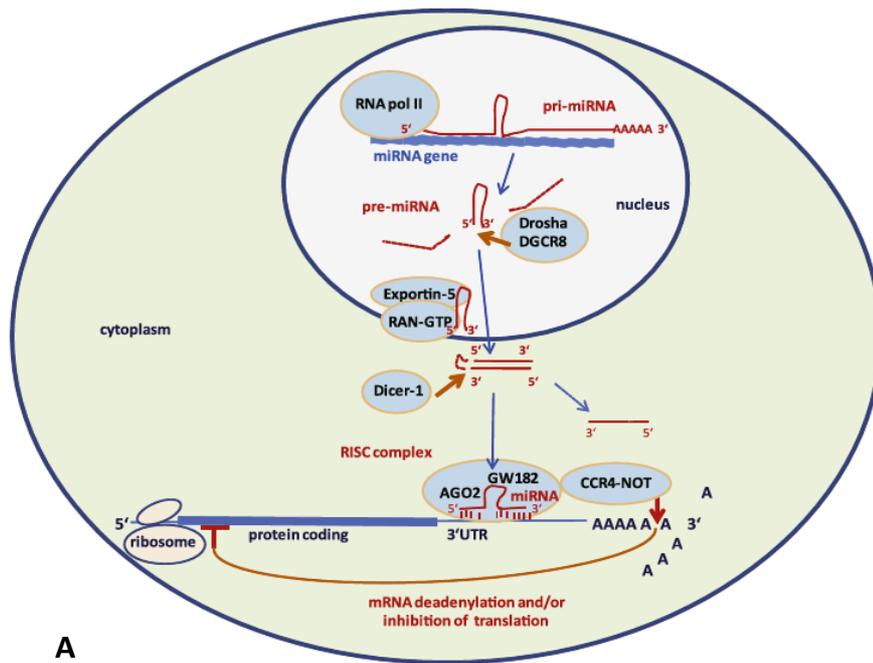


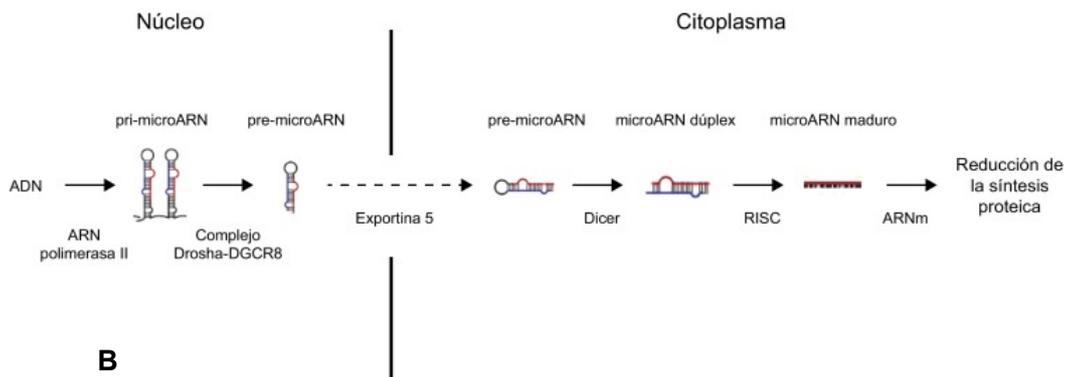
Figura 3. Cronograma de los principales descubrimientos en el campo de los miARN (modificado de Van Rooij. *Circ Res* 2011).

4.1. Biogénesis y mecanismo de acción de los miARN

Los precursores de miARN se generan en el núcleo, son sometidos a una serie de cambios conformacionales y clivajes que conducen a la generación de los miARN maduros que ejercen sus funciones en el citoplasma (76). En la figura 4, vemos en detalle el proceso de formación de los miARN y su mecanismo de acción. En el núcleo, a partir de la secuencia génica específica, se genera un primer transcrito, el miARN primario (pri-miARN), una molécula de alrededor de 1kb. El pri-miARN es procesado en el núcleo, por una endonucleasa RNasa III, denominada Drosha, generando una molécula de 60-70 nucleótidos, el pre-miARN. Este último es transportado al citoplasma por la exportina-5. Una vez en el citoplasma, es liberado del complejo transportador y es cortado por otra endonucleasa, conocida como Dicer: el producto resultante es una molécula de doble cadena, miARN *duplex* que es, a su vez, sometida a la acción de una helicasa que separa las dos cadenas, dando lugar al miARN maduro, de unos 20-25 nucleótidos, mientras que la otra cadena (miARN*) es degradada.



A



B

Figura 4. A. Biogénesis y mecanismo de acción de los miARN (Rebane *et al.* J Allergy Clin Immunol 2013). **B.** Representación esquemática de los principales pasos que llevan a la formación del miARN maduro (Gonzalo-Calvo *et al.* Rev Esp Cardiol 2017).

El miARN maduro es incorporado en un complejo ribonucleoproteico, el *RNA-induced silencing complex* (RISC), que es la maquinaria catalítica que media las principales funciones de regulación de la expresión génica de los miARN. Los mecanismos mediante los cuales el RISC actúa son

fundamentalmente dos: la degradación del ARNm diana y la inhibición de la traducción. La utilización de un mecanismo u otro dependerá del grado de complementariedad con el ARNm diana: en general, si la complementariedad es elevada o total se producirá la degradación del ARNm mientras que si es incompleta se producirá una inhibición de su traducción. Cuando un miARN conduce a la degradación del ARNm, tras la destrucción de la diana, permanece intacto y puede guiar al reconocimiento y al procesamiento de ARNm adicionales (72).

Como hemos mencionado, el genoma humano contiene más de 2000 secuencias que codifican para miARN, llegando a constituir el 1-5% del total de genes expresados. Estas regiones génicas están conservadas filogenéticamente y a menudo se organizan en tándem o en *clusters*. Frecuentemente se encuentran en “sitios frágiles”, zonas sujetas a intercambio de cromatinas, mutaciones o integración de ADN plasmídico, lo que explica su expresión aberrante en la patogénesis de algunas enfermedades (76).

Cada miARN puede tener más de un ARNm diana y cada ARNm puede estar regulado por distintos miARN. Esto complica considerablemente la identificación precisa de las funciones de un determinado miARN y la interpretación de la sobre- o infraexpresión de una determinada molécula (76).

4.2. Técnicas de medición de los miARN

Actualmente existen varias técnicas que permiten determinar el perfil de expresión de los miARN. Por un lado, disponemos de herramientas que miden, en paralelo, la expresión de múltiples miARN, tales como el análisis *microarray* y las técnicas de secuenciación masiva. Por otro lado, el *Northern blotting*, la PCR en tiempo real y la hibridación in situ (ISH, *in situ hybridization*) pueden determinar la concentración de miARN específicos (76). Ya que la expresión de los miARN es prácticamente ubicua, se pueden aplicar tanto sobre células o muestra de tejidos como en suero o plasma. Vamos a analizar brevemente las principales características de dichas técnicas.

- *Microarray*: la capacidad para analizar la expresión de un gran número de genes simultáneamente han hecho de los *microarrays* una herramienta importante para la investigación genómica en diversos campos. Cada *chip* de *microarray* contiene una rejilla que comprende miles de oligonucleótidos, cada uno con una secuencia conocida que corresponde a un gen particular para analizar. De esta forma, en cada experimento se pueden medir con precisión los niveles de expresión de miles de genes. En el caso de la medición de los miARN, el primer paso es la purificación del ARN de la muestra que vamos a examinar. Posteriormente los miARN extraídos serán marcados con nucleótidos fluorescentes. A continuación, serán hibridados directamente con cebadores o *primers* específicos. Considerando la exigua longitud de los miARN, es fundamental la elección de *primers* con alta complementariedad y afinidad por los miARN que se quieren identificar.

El análisis de *microarray* tiene su principal aplicación en la determinación de cambios relativos en la expresión de los miARN entre dos estados, por ejemplo en presencia de enfermedad o en su ausencia. Sin embargo, sus resultados sirven de guía y tienen que ser siempre confirmados con otro método (76).

- Técnicas de secuenciación masiva: actualmente están disponibles plataformas de la *Next Generation Sequencing* para la determinación de los miARN. Respecto a la técnica del *microarray*, su sensibilidad es muy superior, permitiendo también la detección de miARN expresados a baja concentración. Además puede cuantificar los miARN y permite identificar nuevos miARN. Siendo una técnica de más reciente introducción y disponiendo de menor experiencia, existen aún varios aspectos que hay que aclarar y potenciar respecto al análisis y al manejo de la gran cantidad de información que proporciona (76).

- PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*): es la técnica más comúnmente empleada para la determinación de miARN específicos. Es también el método más sensible para la detección y la cuantificación de estas moléculas. Requiere en primer lugar la retrotranscripción de las secuencias de ARN para la formación de ADN complementarios (ADNc). Posteriormente, los procesos de amplificación y detección de secuencias específicas se desarrollan de forma simultánea en el termociclador. La emisión de fluorescencia permite cuantificar en tiempo real el producto de la amplificación (76).

5. Relevancia de los miARN en el ámbito de las enfermedades infecciosas

Los miARN tienen un rol destacado en la regulación de múltiples procesos fisiológicos. Entre ellos, varios trabajos han demostrado la relevancia de los miARN en la regulación de la respuesta inmune, en la patogénesis de la inflamación y de distintas enfermedades infecciosas (77). A continuación, se resumirán las principales evidencias actualmente disponibles y las potenciales aplicaciones de los miARN en este campo.

Uno de los principales ejemplos es la infección por el virus de la hepatitis C (VHC). El VHC, en su ciclo replicativo, utiliza moléculas de la célula huésped, destacando entre ellas un miARN, el miR-122 (78). Este miARN se encuentra sobreexpresado a nivel hepático y resulta fundamental para la estabilidad y la proliferación del VHC. Mediante la correspondiente unión con regiones altamente conservadas del ARN viral, forma un complejo oligomérico miARN-VHC que protege el genoma viral de la degradación nucleolítica y de la respuesta inmune innata. El miR-122 ha sido por lo tanto identificado como una potencial diana terapéutica en el tratamiento de la infección por VHC, llevando al desarrollo de un oligonucleótido, denominado miravirsén, que se une con alta afinidad y especificidad al miR-122 e inhibe su acción. Miravirsén ha demostrado en un estudio de fase 2 una respuesta virológica significativa, con un buen perfil de tolerabilidad y sin aparición de resistencia viral (79).

Análogamente, se ha evidenciado la importancia de los miARN en otros modelos de enfermedades infecciosas. En la mayoría de los casos, los miARN intervendrían en la regulación del delicado equilibrio entre señales pro- y

antiinflamatorias, tan crucial en la reacción del hospedador ante la agresión de un agente patógeno. En particular, en modelos experimentales de infecciones por virus o micobacterias, se ha identificado la modulación de la expresión de algunos miARN como un posible mecanismo de evasión del microorganismo a la respuesta inmunitaria del hospedador. En los modelos descritos, la expresión de específicos miARN inducida por el patógeno, reduce la producción de citoquinas proinflamatorias y consecuentemente la activación inmunitaria, favoreciendo la proliferación y/o la persistencia del microorganismo (80-82).

Varios estudios han sido realizados también en el contexto de sepsis y bacteriemia, sobre todo para investigar el rol de los miARN en la fisiopatología y en las respuestas inmunitarias a las infecciones diseminadas, así como para explorar su utilidad como marcadores diagnósticos y pronósticos (83).

Es necesario precisar que la mayoría de los estudios publicados hasta ahora son el resultado de experimentos *in vitro* o en pequeños grupos de pacientes (83, 84). Una de las primeras evidencias obtenidas *in vivo* fue la proporcionada por el trabajo de Vasilescu *et al.* (85) sobre una pequeña cohorte de pacientes sépticos de una UCI. Mediante análisis de *microarray* sobre los leucocitos de sangre periférica de los pacientes reclutados, los autores determinaron que la expresión de miR-150, previamente identificado como un elemento clave en la diferenciación y activación de las células inmunes, presentaba valores significativamente más bajos en pacientes sépticos, comparados con controles sanos. Los autores concluyeron que dicha molécula podría representar un marcador precoz de sepsis. Un estudio

posterior (86), sobre una muestra más amplia de pacientes de una UCI, comparó la concentración sérica de miR-150 de un grupo de pacientes ingresados por sepsis o shock séptico, con una cohorte de pacientes ingresados por otras causas y con otra de controles sanos. No se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miR-150, pero sí se demostró una asociación con el pronóstico. Los pacientes con niveles más bajos de miR-150 presentaban mayor daño orgánico, concentraciones más elevadas de lactato y mayor riesgo de mortalidad.

El trabajo de Wang *et al.* (87) determinó la expresión de los miARN circulantes en 3 grupos distintos: pacientes con sepsis, con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) por otras causas y controles sanos. Dos moléculas, miR-223 y miR-146a, resultaron significativamente infraexpresadas en los pacientes sépticos respecto a las otras dos cohortes. Este artículo sugería que la capacidad de discriminar entre sepsis y SIRS por otras causas confiere a los miARN mencionados un rol potencial como marcadores de sepsis. Un estudio publicado en 2012 (88), evaluó la capacidad pronóstica de los niveles séricos de miARN en pacientes con sepsis. Se incluyeron pacientes de una UCI y, utilizando la tecnología de la *Next Generation Sequencing*, se comparó la expresión global de los miARN en sangre periférica entre supervivientes y fallecidos. Los resultados evidenciaron una expresión diferencial de 6 miARN entre las dos cohortes que podrían, por lo tanto, representar marcadores pronósticos en pacientes con sepsis. Dentro de las moléculas identificadas como potenciales predictores de mortalidad, destaca miR-223, identificado también en el anterior estudio mencionado, y que

tiene un papel reconocido en la regulación de importantes vías de señalización intracelular en el ámbito de la inmunidad innata (89).

Hasta la fecha, no se ha evaluado la expresión de miARN en pacientes con candidemia o con otras infecciones fúngicas invasivas. En este campo, el único trabajo realizado previamente fue publicado en 2010 y analizó la expresión de miARN en macrófagos murinos tras la exposición a cepas de *C. albicans* inactivadas con el calor (90). El estudio mostró un aumento en la expresión de determinadas moléculas, como miR-455, miR-125, miR-146 y miR-155, sugiriendo la participación de estos miARN en la regulación de la respuesta inmunitaria innata a los hongos.

En síntesis, las evidencias actualmente disponibles proceden de estudios con metodologías distintas, brindan informaciones fragmentadas y aún no suficientemente sólidas. Sin embargo, resaltan el potencial de estas moléculas como marcadores diagnósticos, pronósticos y hasta como dianas terapéuticas.

6. Justificación del trabajo

Como hemos visto en los párrafos anteriores, la candidemia es un problema sanitario que está adquiriendo una importancia creciente en los últimos decenios. Los aspectos demográficos y los avances en el campo médico, han ampliado significativamente la población en riesgo. Por otro lado, la difusión del empleo de los antifúngicos y la introducción de nuevas moléculas en el arsenal terapéutico, han ejercido un impacto ecológico significativo, modificando la epidemiología de las infecciones fúngicas y los patrones de susceptibilidad al tratamiento antimicótico. Pese a los progresos registrados, tanto en el campo diagnóstico como terapéutico, la mortalidad asociada a la candidemia sigue siendo muy elevada, y las razones por estos resultados desalentadores son seguramente múltiples. Existen, al menos en parte, aspectos no modificables que juegan un papel determinante en el mayor riesgo de desenlace fatal, como la fragilidad de los pacientes que desarrollan estas infecciones. Sin embargo, hay ámbitos en los que los márgenes de mejora son todavía amplios. Uno de estos, es el deficiente conocimiento de la dimensión del problema y la escasa sospecha diagnóstica entre los clínicos: identificar los servicios con mayor prevalencia de estas infecciones así como formar sobre las principales enfermedades y condiciones predisponentes es fundamental para la instauración precoz de un tratamiento antifúngico en las situaciones que lo requieren. Otro aspecto, íntimamente relacionado, es el retraso diagnóstico: como sabemos por la información disponible, el tiempo es un parámetro vital para los pacientes con sepsis. Cada hora de retraso en el inicio de un tratamiento adecuado acarrea un aumento significativo en la tasa de mortalidad (91). Pese a los avances mencionados en el diagnóstico de la

candidemia, en la gran mayoría de los centros sanitarios siguen siendo los hemocultivos los que dan una primera orientación sobre la etiología fúngica: eso significa que se necesitan al menos 24-48 horas para que un paciente con una candidemia no sospechada reciba la primera dosis de antifúngico. Si estuvieran rápidamente disponibles marcadores fiables obtenidos a partir de una muestra de sangre del paciente, este tiempo se podría acortar significativamente mejorando así el pronóstico de esta enfermedad.

Es necesario, por tanto, perfeccionar el conocimiento de la fisiopatología de la candidemia y de la interacción con el sistema inmunitario de los pacientes que desarrollan esta infección fúngica invasiva. Poco se conoce, en este ámbito, de las funciones de los miARN. Tanto en la optimización de las herramientas diagnósticas, como en el ámbito pronóstico-terapéutico, estas moléculas podrían revelarse como unos potentes aliados.

II. OBJETIVOS

El objetivo general de nuestro trabajo es determinar el perfil de expresión de los miARN en pacientes con candidemia por *C. albicans* y candidemia por otras especies de *Candida*. Con este fin, hemos establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar mediante secuenciación génica masiva los miARN diferencialmente expresados entre pacientes con candidemia por *C. albicans*, pacientes con candidemia por otras especies de *Candida* y controles.
2. Comprobar mediante qPCR las diferencias en el perfil de expresión de los miARN detectados con secuenciación génica en los distintos grupos experimentales.
3. Correlacionar la expresión de los miARN identificados con el nivel de los marcadores inflamatorios.
4. Correlacionar la expresión de los miARN con la evolución clínica de los pacientes con candidemia.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

1.1. Tipo de estudio y selección de casos y controles

Este estudio se ha llevado a cabo en el Hospital Universitario de Salamanca, que dispone de alrededor de 900 camas, para una población de referencia de 350000 personas. Se trata de un hospital de tercer nivel que está dotado prácticamente de todo tipo de servicios, incluyendo dos áreas de cuidados intensivos, una unidad coronaria y una para pacientes críticos nefrológicos. El presente trabajo es un estudio prospectivo de cohortes y se engloba dentro del proyecto “Estudio de comorbilidad y otros factores asociados con mortalidad en la bacteriemia nosocomial”, que incluye la recogida prospectiva de episodios de candidemia desde el año 2010 en el Hospital Universitario de Salamanca. Entre los pacientes de este estudio se seleccionaron 20 pacientes con candidemia para el análisis del perfil de expresión de miARN y su comparación con 22 controles (figura 5).

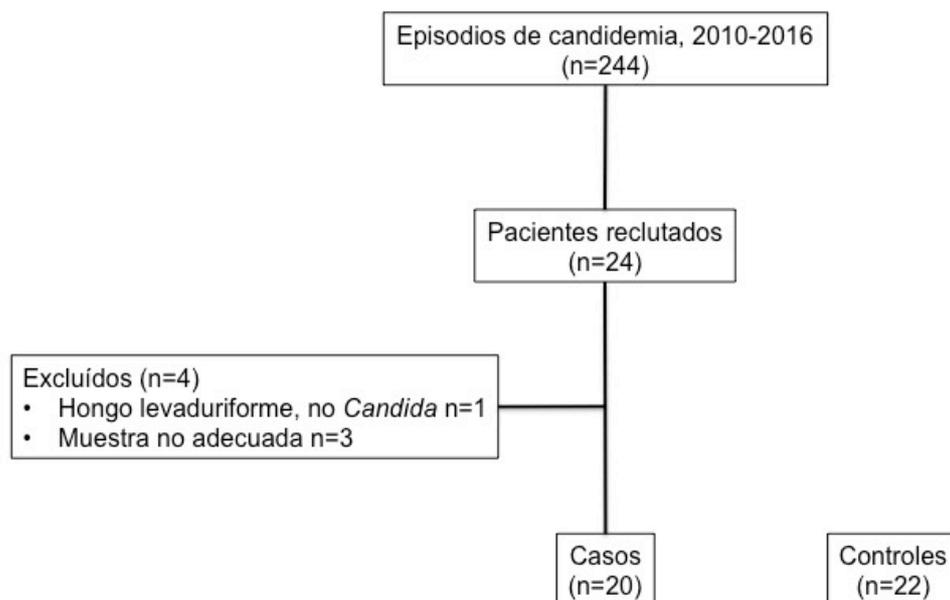


Figura 5. Proceso de reclutamiento de los pacientes con candidemia para el estudio del perfil de expresión de miARN.

A partir de enero de 2010, todos los episodios de candidemia detectados en pacientes adultos fueron notificados por el Servicio de Microbiología e incluidos en el estudio epidemiológico. No se incluyeron episodios de candidemia en menores de 18 años, debido a las potenciales diferencias epidemiológicas y clínicas en la edad pediátrica. Entre estos pacientes, y para analizar el perfil de expresión de los miARN, entre mayo de 2012 y marzo de 2014, se seleccionó un grupo de pacientes con candidemia (n = 20) de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión que se detallan a continuación.

Criterios de inclusión:

- aislamiento de *Candida* spp. en al menos un hemocultivo;
- criterios de sepsis atribuible a la candidemia.

Criterios de exclusión:

- coexistencia de otra infección activa en el momento del diagnóstico de la candidemia (documentación microbiológica en las 72 h previas o alta sospecha clínica);
- haber recibido tratamiento antifúngico al menos 48 horas previamente a la recogida de muestra;
- presentar fallo multiorgánico o estar en fase terminal de la vida.

Además de estos 20 casos, simultáneamente se reclutaron 22 controles entre los pacientes ingresados en el Hospital Universitario de Salamanca, con características demográficas y situación clínica basal superponibles a los casos, que no tuviesen datos clínicos ni microbiológicos de sepsis por *Candida*.

Los criterios de exclusión fueron en este caso:

- coexistencia de otra infección activa (documentación microbiológica en las 72 h previas o alta sospecha clínica);
- tratamiento antifúngico activo;
- presentar fallo multiorgánico o estar en fase terminal de la vida.

1.2. Definición de variables y recogida de datos

Los datos de los casos registrados hasta mayo de 2011, fueron recogidos retrospectivamente, y, desde entonces, de manera prospectiva. Se recogieron variables demográficas, clínicas, microbiológicas y se realizó un seguimiento en los 30 días posteriores al hemocultivo índice para evaluar la evolución del proceso infeccioso. Los datos se recogieron de acuerdo a un

formulario estándar (anexo I) y posteriormente se volcaron a una base de datos en Microsoft Access.

Se definió como candidemia la positividad de al menos un hemocultivo junto con signos y síntomas de sepsis (66). Se clasificó el episodio de candidemia en nosocomial, asociado a cuidados sanitarios o adquirido en la comunidad, de acuerdo al momento y al contexto en el que se obtuvo el aislamiento de *Candida* spp. (92). Así la candidemia se consideró nosocomial cuando ocurrió tras al menos 72 horas de estancia hospitalaria; adquirida en la comunidad, al contrario, en caso de positividad del hemocultivo durante las primeras 72 horas de estancia en pacientes sin contactos hospitalarios ni cuidados sanitarios recientes; por último, asociada a cuidados sanitarios, cuando el hemocultivo positivo se obtuvo en las primeras 72 horas, en pacientes sometidos a atención sanitaria que pudiese predisponer al desarrollo de la candidemia: se consideraron, en este sentido, un ingreso hospitalario con una estancia superior a los 3 días durante el mes anterior al episodio índice, así como la procedencia de un centro socio-sanitario de larga estancia, o cuidados que produjeran una manipulación y/o una alteración de la integridad de la barrera cutáneo-mucosa de los pacientes, como un tratamiento parenteral en régimen de hospital de día u hospitalización domiciliaria, hemodiálisis, etc.

Respecto a la situación basal del paciente, se recogieron escalas de comorbilidades, tales como el Índice de Comorbilidad de Charlson y el *Chronic Disease Score*. El primero es un sistema de evaluación de la esperanza de vida, basado en 19 comorbilidades que han demostrado incidir en la probabilidad de supervivencia del sujeto (93). El *Chronic Disease Score* (94)

mide también el peso de las enfermedades crónicas padecidas por el paciente, pero se obtiene a partir de los medicamentos que el enfermo toma habitualmente. Además de estas escalas, se recogieron de forma específica aquellas enfermedades que pudiesen haber tenido un papel destacado en el desarrollo de la candidemia: es el caso, por ejemplo, de enfermedades tumorales activas, insuficiencia renal crónica, hepatopatía crónica, diabetes mellitus u otras condiciones que cursaran con inmunodepresión o que pudieran predisponer a la invasión por agentes patógenos fúngicos.

Asimismo, se registraron las situaciones próximas al episodio de la candidemia que hubiesen actuado como factores predisponentes: estancia en la UCI superior a 3 días, intervenciones quirúrgicas u otros procedimientos invasivos (por ejemplo: drenajes, punciones, endoscopias con biopsias, biopsias percutáneas, manipulación urológica, etc.) en los 30 días previos al primer hemocultivo positivo.

De la misma forma, se recogieron la transfusión de componentes hemáticos en las dos semanas anteriores, la presencia de sondaje urinario y de acceso venoso. Respecto a este último punto, se registró el tipo de catéter implantado y su empleo, haciendo especial hincapié en la infusión de soluciones de nutrición parenteral.

Como variables clínicas asociadas a la candidemia, se recogió la presencia de fiebre, su entidad y duración; signos locales de flogosis a nivel del acceso venoso, tales como infección del punto de inserción o flebitis, que pudiesen apoyar la posibilidad de una infección asociada al catéter; la instauración de situaciones clínicas, como shock séptico, coagulación

intravascular diseminada y distrés respiratorio del adulto, relacionadas con el episodio de candidemia. La gravedad del paciente se evaluó con la escala *Pitt Bacteremia Score* (95), basada en la temperatura, la situación hemodinámica, el estado mental, la necesidad de ventilación mecánica y el desarrollo de parada cardíaca.

Se registraron también datos analíticos relativos a la función renal (creatinina), a la cifra de leucocitos y neutrófilos y a los marcadores inflamatorios (proteína C reactiva [PCR] y procalcitonina), en las primeras 24 horas desde el desarrollo de la candidemia y en los 3-5 días posteriores.

Desde un punto de vista microbiológico, se registró la especie de *Candida* responsable del proceso infeccioso, su perfil de sensibilidad a los agentes antifúngicos, así como los cultivos de los potenciales focos infecciosos, cuando estaban presentes, y los otros cultivos positivos para evidenciar eventuales infecciones acompañantes.

El foco de la candidemia se identificó en base al historial clínico del paciente, a los datos semiológicos y a los resultados de las pruebas complementarias. De esta forma, la candidemia se consideró asociada a catéter en caso de positividad del cultivo de la punta del catéter por la misma especie de *Candida* aislada en los hemocultivos. Para este fin, se empleó el cultivo semicuantitativo mediante el método de Maki (96) que consiste en rodar 3 o 4 veces la superficie externa de la punta del catéter sobre la superficie de una placa de agar sangre. El criterio de colonización se estableció con la presencia de 15 o más unidades formadoras de colonias (UFC). En el supuesto de no proceder a su retirada, se consideró el catéter como origen de la

candidemia cuando el tiempo de detección difería en más de 2 horas entre los hemocultivos extraídos del catéter y los obtenidos de venas periféricas. En ausencia de pruebas microbiológicas, el catéter fue considerado como probable fuente infecciosa en caso de datos clínicos compatibles, como flebitis o infección del punto de inserción y en ausencia de otros posibles focos. Asimismo, la candidemia se consideró secundaria a infección intraabdominal o urinaria, en caso de cultivo positivo del foco y en presencia de una situación clínica que justificase la invasión fúngica a partir de esas fuentes.

Se registraron los agentes antimicrobianos empleados antes de la documentación microbiológica de la candidemia, los que se pautaron de forma empírica con la aparición del cuadro clínico de la infección fúngica y, por último, el tratamiento definitivo, tras la identificación microbiológica y la realización del estudio de sensibilidad. Asimismo, se realizó un seguimiento evolutivo en los 30 días posteriores al hemocultivo índice, lo que permitió registrar la aparición de metástasis sépticas, como endoftalmitis o endocarditis, la necesidad de cuidados intensivos a raíz del episodio de candidemia y la mortalidad.

1.3. Métodos microbiológicos

El diagnóstico de candidemia se estableció incubando los hemocultivos en el sistema BACTEC 9240 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU). Cuando el dispositivo automatizado señalaba la positividad de un hemocultivo, se llevaba a cabo la tinción de Gram para comprobar el crecimiento del microorganismo. Además, se realizaban subcultivos del material en distintos medios, agar sangre, agar MacConkey, agar chocolate y agar Sabouraud

cloranfenicol-gentamicina. Si la tinción de Gram confirmaba la presencia de levaduras, la muestra se subcultivaba también en el medio cromogénico *Brilliance Candida* agar (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) que además de favorecer la rápida identificación presuntiva de diferentes especies de *Candida*, permitía detectar los cultivos mixtos. Desde el 2010 hasta el 2012, la identificación definitiva de la especie de *Candida* se llevó a cabo con métodos bioquímicos y enzimáticos (*RapID Yeast Plus System* [Remel, Waltham, MA, EEUU]), y posteriormente se utilizó la identificación proteómica mediante el método MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). La sensibilidad a los antifúngicos, por otro lado, se efectuó con la técnica colorimétrica de microdilución en caldo (*Sensititre YeastOne*, Thermo Scientific [Waltham, MA, EEUU]), de acuerdo a las directrices del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (97). Los antifúngicos ensayados fueron: amfotericina B, caspofungina, micafungina, anidulafungina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol y flucitosina.

2. Obtención de muestras sanguíneas y análisis de la expresión de miARN

2.1. Obtención y procesamiento de muestras

Tras la obtención del consentimiento informado, se recogieron las muestras sanguíneas, para lo que se utilizó un tubo específico para conservación y análisis de ARN (*Pax GeneTM Blood RNA Tube*, Qiagen) que se conservó a -20°C. Todas las muestras obtenidas se almacenaron, oportunamente identificadas, en el Servicio de Microbiología del Hospital

Universitario de Salamanca hasta su posterior utilización. En el caso de los pacientes con candidemia, la extracción sanguínea se realizó en las primeras 24 horas desde la notificación del primer cultivo positivo. Entre los controles, junto con las muestras sanguíneas anteriormente descritas, se obtuvo también un set de hemocultivos para asegurar que el paciente no tuviese candidemia y/o bacteriemia de otro origen.

Una vez completado el reclutamiento de los pacientes, se realizó de forma simultánea sobre el conjunto de las muestras la extracción del ARN total mediante un *kit* específico de extracción (*PAXgene™ Blood RNA Kit*, Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ARN se conservó a -80°C tras haber determinado su cuantía y pureza mediante un espectrofotómetro, calculando la absorbancia a 260 nm y el ratio de absorbancias a 260/280 nm, respectivamente.

Posteriormente se realizó el análisis de expresión de miARN, que consistió en dos fases. Inicialmente se evaluó la expresión global de los miARN mediante una técnica de secuenciación masiva. Aquellos miARN específicos, identificados como diferencialmente expresados, fueron posteriormente analizados mediante PCR en tiempo real para comprobar estos resultados, como se detalla a continuación.

2.2. Análisis de miARN mediante secuenciación masiva

La tecnología de secuenciación masiva o NGS (del inglés *Next Generation Sequencing*) permite obtener información tanto de las secuencias existentes dentro de un determinado tipo celular o tejido, como cuantificar el número de veces que está presente dicha secuencia. Los ensayos de NGS se llevaron a cabo con la plataforma Illumina®, en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) en Madrid (España). La plataforma Illumina®, de forma resumida y simplificada, genera múltiples copias de los ácidos nucleicos que se desea secuenciar mediante un mecanismo denominado “amplificación en puente” (*bridge amplification*). Tras la obtención de una población de secuencias clonales, tiene lugar la fase de secuenciación por síntesis, que se caracteriza por el uso de nucleótidos marcados con fluoróforos y su posterior lectura mediante láser (98). Las etapas principales del mecanismo de secuenciación masiva con Illumina® se detallan esquemáticamente en la figura 6.

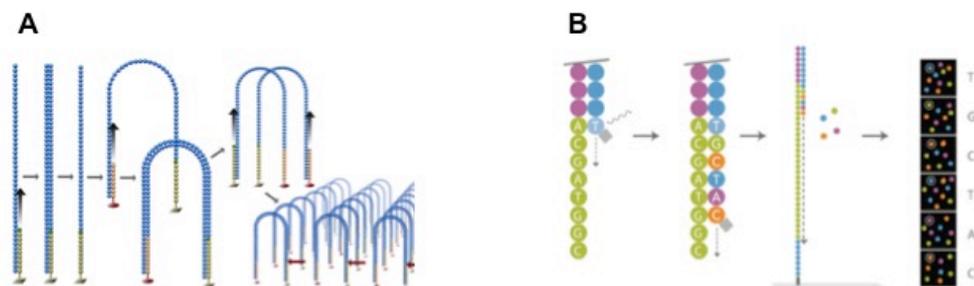


Figura 6. Proceso de secuenciación masiva con la plataforma Illumina®.
A. Amplificación en puente de los ácidos nucleicos objeto de estudio.
B. Secuenciación por síntesis mediante nucleótidos marcados con fluoróforos.

Mediante este método se analizaron separadamente las muestras de los pacientes con candidemia por *C. albicans* (CA) de las procedentes de pacientes con infección por especies de *C. no albicans* (CNA). Concretamente, se analizaron 4 muestras en duplicado para cada grupo y cada muestra estaba compuesta por los miARN de dos pacientes con la misma condición (CA o CNA). Asimismo se analizaron, siempre en duplicado, 4 muestras procedentes de los controles, cada una de las cuales estaba compuesta por los miARN de cuatro controles. En conjunto, por lo tanto, se evaluaron 12 muestras, 4 procedentes de pacientes con candidemia por *C. albicans*, 4 de candidemia por otras especies de *Candida* y 4 de controles.

Partiendo del ARN total extraído para estas muestras, la fracción de tamaño comprendido entre 16 y 32 nucleótidos fue separada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y seleccionada para su secuenciación. Los ARN seleccionados fueron etiquetados mediante la unión de secuencias adaptadoras para, a continuación, proceder a su amplificación previa al proceso de secuenciación, según hemos descrito anteriormente. Las secuencias y el número de lecturas de cada muestra fueron tratadas bioinformáticamente para la obtención de los resultados (99). Eliminadas las secuencias de los adaptadores (100), se cuantificó el número de lecturas (101) y se clasificaron mediante su alineamiento con la base de datos disponible en el momento del experimento: miRBase versión 21 (junio 2014, 2589 secuencias humanas) (74). Por cada muestra se obtuvo un número de lecturas comprendido entre 3,3 y 10 millones. El porcentaje de lecturas que se alineó con elementos incluidos en miRBase estaba en un rango comprendido entre el 68 y el 76% (tabla 2).

Tabla 2. Procesamiento bioinformático de los resultados de la NGS y alineamiento con la base datos humana de miARN.

Sample	Cond	Raw.Cts	After.PP	P.Dup	Aligned	P.Al	Lib.Sz	Norm.F
C1RNA	Candidemia1	10075025	9608838	95.0	6983064	72.7	6982828	0.51794
C2RNA	Candidemia1	3306609	3119504	92.5	2174164	69.7	2174041	1.03853
C3RNA	Candidemia1	4750241	4518378	93.4	3416263	75.6	3416028	1.12162
C4RNA	Candidemia1	4853306	4465903	92.4	3092966	69.3	3092810	0.98992
C5RNA	Candidemia2	4326435	4120260	93.5	2833500	68.8	2833309	1.19838
C6RNA	Candidemia2	4047963	3792675	92.9	2832758	74.7	2832584	1.06594
C7RNA	Candidemia2	5569235	5323215	93.5	3733940	70.1	3733646	1.26192
C8RNA	Candidemia2	4077918	3829055	92.8	2787281	72.8	2787107	1.16215
Control1RNA	Control	6647024	6202119	93.3	4387647	70.7	4387414	0.90505
Control2RNA	Control	5628543	5344760	93.1	3847670	72.0	3847429	1.00874
Control3RNA	Control	6219161	5926314	93.5	4075619	68.8	4075338	1.23319
Control4RNA	Control	7024762	6688935	93.9	4720896	70.6	4720684	0.79388

Por cada muestra, se presenta la siguiente información: Condición (Cond; Candidemia1 = candidemia por *C. albicans*; Candidemia2 = candidemia por *C. no albicans*); número de lecturas obtenidas por cada muestra (Raw.Cts); número de lecturas tras pre-procesamiento (After.PP); porcentaje de lecturas duplicadas (P.Dup); número de lecturas alineadas con la base de datos de miARN (Aligned); porcentaje de alineamiento (P.Al); tamaño de la biblioteca usada para la normalización (Lib.sz); factores de normalización (Norm.F).

2.3. Análisis de expresión de miARN mediante qPCR con transcriptasa inversa

2.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa: aspectos generales

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN de una muestra. La tecnología de la qPCR permite detectar y evaluar la progresión de la reacción de amplificación en cada uno de sus ciclos, todo ello mediante un termociclador y un fluorímetro, que permiten detectar la fluorescencia emitida por componentes intercalantes unidos al ADN. Se divide en 4 fases principales:

a) la fase inicial, en la cual la fluorescencia de los primeros ciclos es mínima y no supera la fluorescencia de fondo del medio circundante, lo que permite calcular la línea base;

b) la fase exponencial temprana, en la cual la fluorescencia producida por el producto de PCR rebasa el umbral definido. El ciclo en el cual la fluorescencia ha alcanzado el umbral definido se conoce como ciclo umbral o Ct (del inglés *Cycle threshold*). Este valor es representativo de la cantidad inicial de copias de ADN de la muestra que hay en la reacción y es usado en los cálculos posteriores. Por tanto, cuanto más bajo sea el valor de Ct, mayor es el número de copias de ADN de la muestra en la reacción;

c) la fase lineal, en la cual se alcanza un estado de amplificación óptima donde la cantidad de producto de PCR se duplica en cada ciclo;

d) por último, la fase de meseta o estacionaria, en la cual los reactivos y el equipo han alcanzado el límite de detección y la reacción ha terminado. Un ejemplo de la curva de la qPCR se muestra en la figura 7 (102).

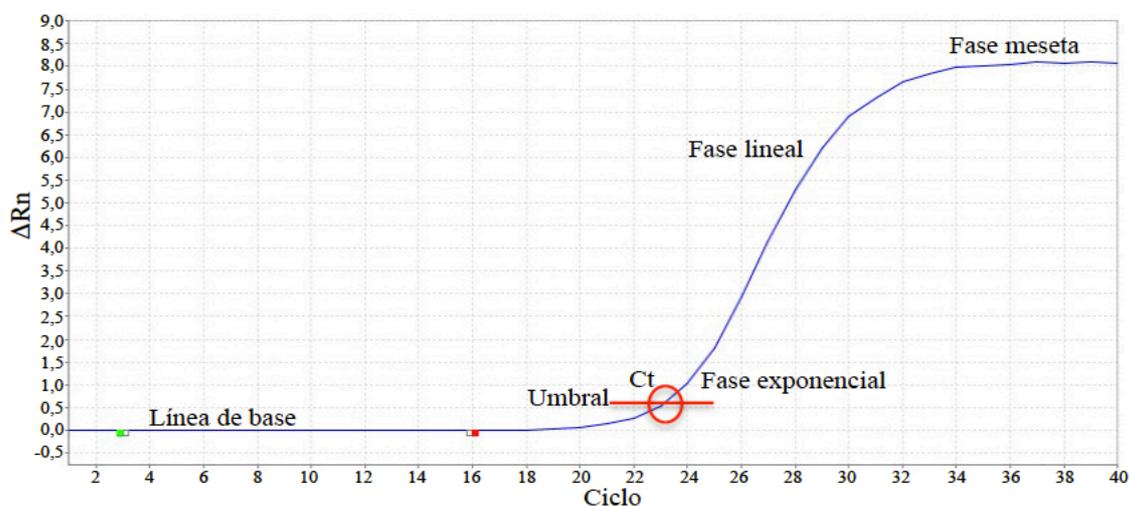


Figura 7. Modelo de curva de amplificación de la qPCR.

Dado que la qPCR amplifica ADN, para poder determinar la cantidad de ARN en una muestra, tanto ARNm como ARN de pequeño tamaño como los miARN, es necesario antes realizar una reacción de transcripción inversa, de donde deriva la sigla RT-qPCR (del inglés *reverse transcription* qPCR). En esta reacción se sintetiza ADN complementario (ADNc) a partir de ARN, y es el ADNc el que posteriormente se cuantifica mediante qPCR.

Esta cuantificación se denomina relativa ya que se realiza comparando la expresión del gen analizado respecto a la expresión de un gen de referencia cuya expresión es uniforme en diferentes condiciones experimentales. Este gen control sirve para normalizar posibles variaciones de la cantidad de ADNc y, por extensión, de la cantidad de ARN disponible en la muestra original. En definitiva, la RT-qPCR nos permite medir la expresión de miARN específicos presentes en una muestra, realizando la transcripción del ARN en ADNc y la posterior cuantificación del número de copias del miARN analizado, ajustada a la expresión de un gen control.

El termociclador utilizado en este trabajo para realizar tanto la reacción de transcriptasa inversa como la qPCR ha sido el equipo *Step-One-Plus* de *Applied Biosystems*, que emplea un sistema de detección de fluorescencia basado en *SYBR Green*. Este fluorocromo interacciona con el surco menor del ADN, emitiendo 1000 veces más fluorescencia que cuando está libre en solución, por lo que el incremento en la cantidad de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Resumiendo el procedimiento, cuando se añade el fluorocromo *SYBR Green I* a la muestra, este se une inmediatamente a todo el ADN de doble cadena. Durante la qPCR,

la ADN polimerasa amplifica el gen diana, lo que crea el producto de qPCR, o amplicón. A continuación, el fluorocromo se une a cada copia nueva del ADN de doble cadena. A medida que avanza la qPCR, se produce más amplicón y dado que el fluorocromo se une a todo el ADN de doble cadena, el resultado es un aumento de la intensidad de la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de producto de qPCR de doble cadena producido (102).

2.3.2. Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc a partir de ARN total para la determinación posterior de miARN se realizó mediante una reacción de transcripción inversa usando *primers* específicos del *kit* de *miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR* (Exiqon). Este sistema permite amplificar miARN mediante una transcripción inversa universal de ADNc, seguida de una amplificación por qPCR en tiempo real con *primers* específicos de miARN y mejorados con LNA (del inglés, *locked nucleic acid*). Para la transcripción inversa se mezclaron 2 μL de ARN total ajustado a una concentración de 10 ng/ μL , con 8 μL de la mezcla cuya composición se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Composición de la mezcla empleada para la síntesis de ADNc.

Componente	Volumen de la reacción (μL)
<i>Buffer</i> de la reacción (5x)	2
Agua libre de nucleasas	5
Mezcla de enzimas (<i>enzyme mix</i>)	1
ARN total	2
Volumen final	10

Las mezclas fueron incubadas en el termociclador a 42 °C durante 60 minutos y a 95 °C por 5 minutos. El ADNc obtenido se diluyó a 1:80 y se conservó en alícuotas a -80 °C hasta su posterior utilización como molde para las qPCR (102).

2.3.3. Análisis de la estabilidad de expresión de los genes de referencia

El gen de referencia ideal es aquel que se expresa de forma consistente en todas las muestras analizadas independientemente de las condiciones experimentales y que presenta unos niveles de expresión comparables a los del gen diana. Numerosos estudios han demostrado que la expresión de estos genes de referencia comunes varían con el tipo de tejido, así como con el estado fisiológico, por lo que la idoneidad de un gen de referencia concreto puede variar con el diseño y las condiciones experimentales inherentes al estudio (103, 104). Por este motivo, se han desarrollado diferentes algoritmos matemáticos que permiten analizar la idoneidad de los genes de referencia para cada experimento. En nuestro trabajo hemos empleado 3 métodos distintos (102):

a) el algoritmo *GeNorm*, que clasifica los genes de referencia candidatos en función de la estabilidad de su expresión. Calculando la variación media de los niveles de expresión y comparando con los demás genes candidatos, se obtiene un valor denominado M que es inversamente proporcional a la estabilidad del gen en estudio (105);

b) el programa *NormFinder*, que, a partir de los valores Ct, aplica un algoritmo matemático basado en modelos de estimación de la variación de la expresión génica y es capaz de evaluar las variaciones presentes dentro de los grupos experimentales, así como compararlos entre sí. De este modo, los genes con una variación inter- e intra-grupo menor son considerados los más estables (106);

c) el programa *BestKeeper*, el cual tiene en cuenta los valores de Ct de los genes de referencia candidatos y utiliza un algoritmo estadístico en el que se calcula la desviación estándar de cada gen, y el coeficiente de correlación de Pearson para cada par de genes de referencia candidatos. El gen con la desviación estándar más baja y el coeficiente de correlación más alto es considerado el más estable (107).

Como potenciales genes de referencia, por haber sido utilizados previamente con este fin, en nuestro trabajo, se seleccionaron U6, SNORD48, hsa-miR-103a-3p y hsa-miR-16-5p (108-110). En estos dos miARN empleamos la nomenclatura que incluye el prefijo hsa- (que indica que se trata de un miARN humano), y el sufijo -3p o -5p (que indica la cercanía, respectivamente, al extremo 3' o 5' del pre-micro-ARN). En el texto se hará referencia a los miARN también por su nombre abreviado (en este caso miR-103 y miR-16, respectivamente). En la tabla 4, se muestran las secuencias de las moléculas empleadas como genes de referencia candidatos (proporcionadas como *kit* comerciales de Exiqon).

Tabla 4. Secuencias de los genes de referencia candidatos.

Gen	Secuencia
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
U6	GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUAUACUAAAAUUGGAACGAUACAG AGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGAUGACACGCAAAUUCG UGAAGCGUCCAUUUUUU
SNORD48	AGUGAUGAUGACCCCAGGUAACUCUGAGUGUGUCGCUGAUGCCA UCACCGCAGCGCUCUGACC

La estabilidad de la expresión de dichos genes se evaluó en nuestro trabajo usando los algoritmos estadísticos *GeNorm* y *NormFinder* incorporados en el programa Genex versión 5.44 y la plantilla de Excel del algoritmo *BestKeeper*. Para este análisis se utilizaron muestras de 10 individuos con candidemia y de 10 controles.

El análisis de la estabilidad de expresión de los genes de referencia candidatos mostró que miR-103 fue el gen de referencia más estable, por lo que se seleccionó como gen de referencia de nuestras muestras (figura 8).

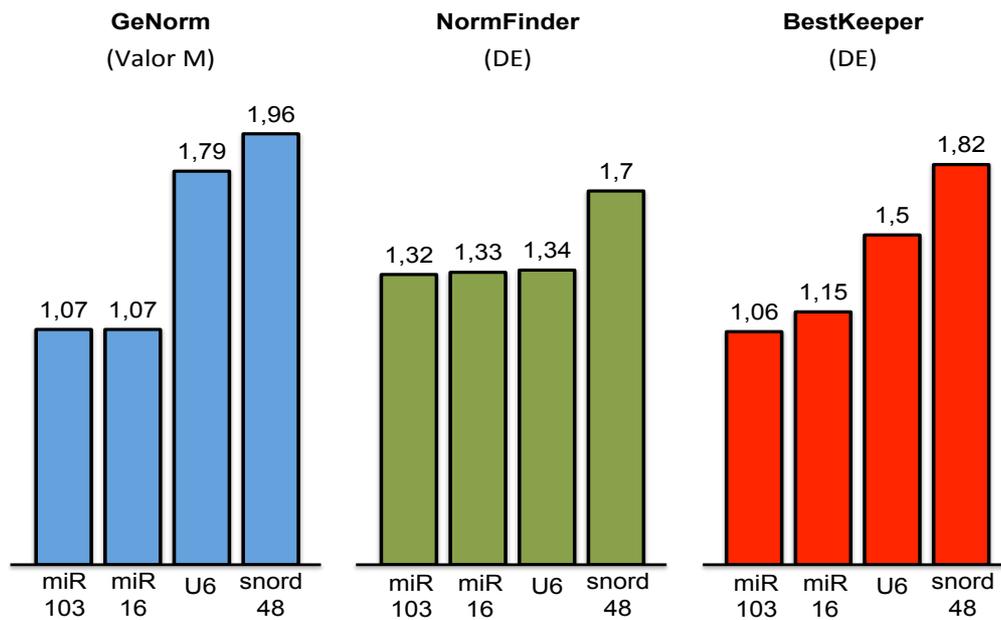


Figura 8. Resultados del análisis de la estabilidad de los genes de referencia candidatos.

2.3.4. Cuantificación relativa de miARN por qPCR

Se investigaron específicamente los miARN identificados con los experimentos de secuenciación masiva detallados en los apartados anteriores. Las secuencias empleadas como *primers* fueron proporcionadas por Exiqon y se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de los miARN objeto de estudio.

miARN	Secuencia
hsa-miR-99b-5p	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG
hsa-miR-125a-5p	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA
hsa-miR-5690	UCAGCUACUACCUCUAUUAGG
hsa-miR-584-5p	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG
hsa-miR-144-5p	GGAUAUCAUCAUAUACUGUAAG
hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA

La PCR en tiempo real para la determinación de miARN se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del fabricante de los reactivos. La temperatura de anillamiento utilizada para cada uno de los *primers* fue de 60°C. Cada amplificación se realizó por duplicado para minimizar la variabilidad de concentración en las muestras. El volumen final empleado para la reacción de amplificación fue de 10 μ L, con los siguientes componentes:

- 5 μ L de *ExiLENT SYBR Green master mix*;
- 1 μ L de *PCR Primer mix*;
- 4 μ L de ADNc.

Las condiciones de PCR utilizadas para amplificar cada uno de los oligonucleótidos se describen en la figura 9.

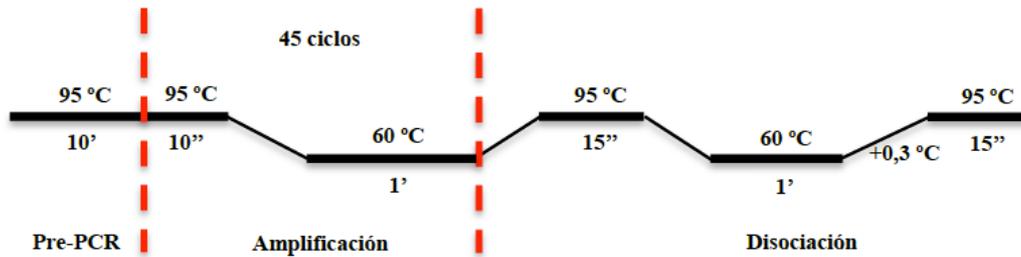


Figura 9. Condiciones de la qPCR para la amplificación de los miARN.

La cuantificación relativa de la expresión de los miARN fue calculada usando el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que es un modelo matemático que calcula los cambios en la expresión génica como una diferencia entre una muestra experimental (p. ej., pacientes con candidemia) y una muestra de referencia que permite la calibración (p. ej., sujetos controles). Este método incluye una corrección de la eficiencia de amplificación, en la que se asume como hipótesis que la eficiencia de la amplificación del gen diana y el gen de referencia es similar (102). La expresión de estos miARN se normalizó con la de miR-103, el gen de referencia en nuestro estudio, tal y como se ha descrito.

3. Análisis estadístico

3.1. Análisis del perfil de expresión de miARN mediante NGS

Se consideraron para el análisis estadístico sólo aquellos miARN que presentaran al menos 1 copia por millón en al menos 4 muestras (195 miARN). Tras la normalización por cuantiles, se comparó la expresión de los miARN en los diferentes grupos: candidemia por *C. albicans* frente a controles; candidemia por *C. no albicans* frente a controles; candidemia por *C. albicans* frente a *C. no albicans*. Para cada miARN se determinó la expresión media, la diferencia de expresión (*fold change*), y el valor de la *P* usando la prueba *t* de Student. Dado que el análisis estadístico implicaba múltiples comparaciones, se obtuvo un valor ajustado de la *P* de acuerdo al método de *False Discovery Rate* (FDR) (111). Para ampliar el listado inicial de miARN que se sometieron a comprobación posterior mediante RT-qPCR, se fijó un valor umbral de la *P* ajustada $< 0,2$.

3.2. Análisis de resultados de la qPCR

El cálculo de la expresión cuantitativa relativa de los miARN estudiados se realizó mediante una plantilla de Excel que incluyó las ecuaciones de la PCR cuantitativa relativa. Se comprobó la ausencia de valores extremos mediante una plantilla de Excel con el test de Grubbs (112).

3.3. Análisis de variables clínico-analíticas y correlación con la expresión de miARN

Las variables cuantitativas se presentan como la media y su desviación estándar (DE) y fueron analizadas mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson y la prueba *t* de Student. Cuando fue necesario categorizar variables continuas se utilizó como punto de corte el percentil 50 de las mismas. Las variables cualitativas se presentan como frecuencias absolutas y relativas y se analizaron mediante el test χ^2 . El nivel de significación α se estableció en el 5% ($\alpha = 0,05$). El análisis estadístico de la comparación de variables entre el grupo de pacientes y el grupo control, y las diferencias en la expresión cuantitativa de los miARN, así como los análisis de correlación, se realizaron con el programa SPSS versión 20 para MAC OS (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

4. Aspectos éticos

Este proyecto de investigación se ha realizado con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salud de Salamanca. El trabajo se ha llevado a cabo de acuerdo a los principios de la declaración de Helsinki, a las normas de buena práctica clínica y a la legislación vigente. Los pacientes y los controles fueron oportunamente informados de las condiciones del estudio y firmaron el consentimiento informado (que se incluye en el anexo II), antes de la extracción de las muestras.

5. Financiación

El estudio ha sido financiado con una subvención concedida por la Gerencia Regional de Salud de la Junta de Castilla y León al proyecto “Análisis de expresión de microARN en pacientes con candidemia” (referencia GRS 881/A/13), cuyo investigador principal es el Dr. Hugo Guillermo Ternavasio de la Vega. El presente estudio se engloba además dentro del proyecto “Estudio de comorbilidad y otros factores asociados con mortalidad en la bacteriemia nosocomial” cuyo investigador principal es el Dr. Miguel Marcos. Este proyecto está aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Área de Salamanca y realizado en el Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

IV. RESULTADOS

1. Registro epidemiológico de los episodios de candidemia

Entre enero de 2010 y agosto de 2016, se detectaron 244 casos de candidemia en pacientes adultos en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Las principales características de los pacientes se muestran en la tabla 6.

La gran mayoría de los episodios (94%) fue de origen nosocomial o asociada a cuidados sanitarios. Entre las infecciones nosocomiales, el 34% se registró en servicios médicos (Medicina Interna 46, Digestivo 15, Enfermedades Infecciosas 4), el 27% en servicios quirúrgicos, el 26% en Oncología y Hematología y el 13% en Unidades de Cuidados Intensivos. La edad media fue de 68 años y el 59% fueron varones. El valor medio del índice de comorbilidad de Charlson fue de 3,2. Respecto a las enfermedades subyacentes predisponentes al desarrollo de candidemia, las más frecuentes fueron las neoplasias sólidas y hematológicas, en conjunto presentes en más de la mitad de los pacientes y la diabetes mellitus en el 25% de los casos. Otros factores de riesgo relevantes fueron la presencia de un catéter venoso central (65%) y la administración de nutrición parenteral (59%). Además, el 54% de los pacientes había sido sometido a procedimientos invasivos y el 33% a intervenciones quirúrgicas en el mes anterior a la candidemia. Casi la mitad era portador de sonda vesical y el 45% había recibido transfusiones de hemoderivados.

Tabla 6. Características basales de los pacientes (n=244).

Edad (años), media (rango)	68,5 (20-98)
Varones, n (%)	145 (59,4)
Charlson, media (rango)	3,2 (0-11)
Comorbilidades, n (%)	
Neoplasia sólida	112 (45,9)
Diabetes mellitus	61 (25,0)
Neoplasia hematológica	48 (19,7)
Trasplante de médula ósea	23 (9,4)
Hepatopatía crónica	18 (7,4)
Insuficiencia renal crónica	16 (6,6)
Conectivopatía	11 (4,5)
Trasplante órgano sólido	2 (0,8)
Factores de riesgo	
Catéter venoso central	158 (64,8)
Nutrición parenteral	145 (59,4)
Procedimientos invasivos	132 (54,1)
Sonda vesical	121 (49,6)
Transfusiones	111 (45,5)
Cirugía	81 (33,2)
Quimioterapia	52 (21,3)
Estancia en UCI	46 (18,9)
Tratamiento corticoideo	36 (14,8)
Tratamiento inmunosupresor	27 (11,1)
Neutropenia	25 (10,2)
Origen, n (%)	
Nosocomial	193 (79,1)
Medicina Interna	65 (33,7)
Cirugía	52 (26,9)
Onco-Hematología	51 (26,4)
UCI	26 (13,5)
Asociada a cuidados sanitarios	36 (14,8)
Adquirida en la comunidad	15 (6,1)

UCI: Unidades de Cuidados Intensivos.

Las principales características microbiológicas y clínicas de los episodios de candidemia se detallan en la tabla 7. Se aislaron 249 cepas de *Candida* spp., ya que 5 de los episodios detectados fueron polifúngicos. Las especies más frecuentemente aisladas fueron *C. parapsilosis* (40%) y *C. albicans* (39%). *C. glabrata* fue responsable del 11% de los casos de candidemia, mientras que las otras especies tuvieron una importancia marginal. Respecto a la sensibilidad a los antifúngicos, se registró en conjunto un 10% de resistencia o sensibilidad dosis-dependiente a azoles.

Aproximadamente 1 de cada 5 pacientes presentó shock séptico secundario a la candidemia. El 11% requirió ingreso en una Unidad de Cuidados Intensivos. El valor medio del *Pitt Bacteremia Score* fue de 2,3. El foco infeccioso no se identificó en el 44% de los casos. En los restantes episodios, la candidemia fue asociada a catéter (34%), secundaria a infección abdominal (16%) o urinaria (7%). En 15 pacientes (6%) se identificaron metástasis sépticas, siendo la más frecuente la endoftalmitis (5%). El tratamiento empírico resultó acertado en el 25% de los casos, mientras que el tratamiento definitivo fue correcto en el 88%. El fármaco más utilizado fue el fluconazol (46%), seguido por las equinocandinas que fueron la primera opción terapéutica en el 30% de los casos. Veinticinco pacientes (10%) no recibieron ningún tipo de tratamiento antifúngico. La mortalidad global a los 30 días fue del 33% y más de la mitad de los fallecimientos (53%) se registró durante los primeros 7 días de seguimiento. El análisis del papel de diferentes escalas de comorbilidad y gravedad en la predicción de la mortalidad en nuestra cohorte se encuentra detallado en el artículo disponible en el anexo III de este trabajo (113).

Tabla 7. Características microbiológicas y clínicas de los episodios de candidemia.

Especie fúngica, n=249*	n (%)
<i>Candida parapsilosis</i>	100 (40,2)
<i>Candida albicans</i>	97 (39,0)
<i>Candida glabrata</i>	27 (10,8)
<i>Candida tropicalis</i>	11 (4,4)
<i>Candida krusei</i>	6 (2,4)
Otras [#]	8 (3,2)
Sensibilidad a azoles, n=249*	n (%)
Sensible	210 (84,3)
Sensible dosis-dependiente	4 (1,6)
Resistente	21 (8,4)
Datos no disponibles	14 (5,6)
Shock séptico, n (%)	50 (20,5)
Necesidad de cuidados intensivos, n (%)	28 (11,5)
<i>Pitt bacteremia score</i> , media (rango)	2,3 (0-11)
Foco infeccioso, n (%)	
Desconocido	107 (43,8)
Catéter	82 (33,6)
Abdominal	38 (15,6)
Urinario	17 (7,0)
Metástasis sépticas, n (%)	15 (6,1)
Endoftalmitis	12 (4,9)
Endocarditis	2 (0,8)
Candidiasis hepatoesplénica	1 (0,4)
Tratamiento empírico correcto, n (%)	62 (25,4)
Tratamiento definitivo correcto, n (%)	215 (88,1)
Antifúngico empleado, n (%)	
Fluconazol	112 (45,9)
Equinocandinas	73 (29,9)
Amfotericina B	26 (10,7)
Combinación ^{&}	8 (3,3)
No tratamiento	25 (10,2)
Mortalidad a 30 días, n (%)	81 (33,2)

* Se registraron 5 episodios de candidemia polifúngica: 3 por *C. albicans* y *C. parapsilosis*, 1 por *C. albicans* y *C. glabrata*, 1 por *C. krusei* y *C. tropicalis*.

[#] *C. guilliermondii* 2, *C. lusitaniae* 1, *C. lipolytica* 1, especies no identificadas 4.

[&] En 4 casos se asociaron una equinocandina y fluconazol; en 3 casos amfotericina B y equinocandina; en 1 caso amfotericina B y fluconazol.

2. Cohortes del estudio experimental

Para el estudio del perfil de expresión de miARN, se seleccionaron 20 casos y 22 controles. Las principales características de las dos cohortes se describen en la tabla 8.

Tabla 8. Análisis comparativo de las características de casos y controles.

	Candidemia (n=20)	Controles (n=22)	P
Edad (años), media (DE)	71,9 (16,7)	70,3 (11,9)	0,71
Varones, n (%)	11 (55,0)	13 (59,1)	0,76
Charlson, media (DE)	2,6 (2,7)	3,1 (3,1)	0,55
Servicio de procedencia, n (%)			0,23
Cirugía	6 (30,0)	3 (13,6)	
Medicina Interna	10 (50,0)	16 (72,7)	
Hematología	2 (10,0)	2 (9,1)	
UCI	2 (10,0)	1 (4,6)	
Factores de riesgo, n (%)			
CVC	15 (75,0)	6 (27,3)	0,002
Sonda vesical	14 (70,0)	10 (45,5)	0,11
Nutrición parenteral	10 (50,0)	11 (50,0)	0,99
Neoplasia	7 (35,0)	9 (40,9)	0,72
Diabetes mellitus	7 (35,0)	5 (22,7)	0,38
Cirugía previa	7 (35,0)	4 (18,2)	0,22
Inmunosupresión	4 (20,0)	7 (31,8)	0,38
Neutropenia	1 (5,0)	1 (4,5)	0,99
Días de estancia, media (DE)	20,8 (23,8)	18,7 (23,9)	0,77

DE: desviación estándar; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos; CVC: catéter venoso central.

Los dos grupos resultaron homogéneos respecto a las principales características demográficas y clínicas. Como podemos apreciar en la tabla, la edad media fue superponible y la distribución por sexo similar. Los pacientes de las dos cohortes presentaban asimismo una carga de comorbilidades

parecida, medida por el índice de Charlson. Tampoco se registraron diferencias significativas respecto a los días de hospitalización en el momento de la extracción de la muestra. Respecto a las condiciones predisponentes para el desarrollo de candidemia, la única diferencia estadísticamente significativa se detectó en la presencia de catéter venoso central: entre los casos de candidemia, dicho factor de riesgo resultó significativamente más frecuente (75% vs. 27%, $P = 0,002$).

Entre los 20 episodios de candidemia incluidos en este trabajo, 10 fueron causados por *C. albicans* y 10 por otras especies de *Candida*. En la tabla 9 se describen las principales características clínicas y evolutivas, desglosadas según la etiología.

Tabla 9. Características clínicas y evolutivas de los casos de candidemia.

	<i>C. albicans</i> (n=10)	<i>C. no albicans</i> (n=10)	Todos (n=20)
Edad (años), media (DE)	68,3 (20,2)	75,6 (16,5)	71,9 (16,7)
Varones, n (%)	6 (60,0)	5 (50,0)	11 (55,0)
Charlson, media (DE)	2,2 (3,5)	3,0 (1,7)	2,6 (2,7)
Foco infeccioso, n (%)			
Catéter	5 (50,0)	5 (50,0)	10 (50,0)
Desconocido	1 (10,0)	4 (40,0)	5 (25,0)
Abdominal	3 (30,0)	0 (0)	3 (15,0)
Urinario	1 (10,0)	1 (10,0)	2 (10,0)
Shock, n (%)	2 (20,0)	0 (0)	2 (10,0)
Mortalidad a 30 días, n (%)	3 (30,0)	0 (0)	3 (15,0)

DE: desviación estándar

La candidemia estuvo en la mitad de los casos asociada a catéter vascular; dos pacientes presentaron shock séptico asociado a la candidemia y 3 fallecieron durante los primeros 30 días de seguimiento.

En la tabla 10 se muestran los valores medios de la PCR y de los leucocitos, para comparar la respuesta inflamatoria en los distintos grupos experimentales.

Tabla 10. Valores medios (DE) de los marcadores inflamatorios en las distintas cohortes experimentales.

	Casos (n =20)	<i>C. albicans</i> (n=10)	<i>C. no albicans</i> (n=10)	Controles (n=22)
PCR, mg/dL	7,4 (4,5)	9,5 (4,9)	5,3 (3,0)	5,2 (10,0)
Leucocitos, x10 ³ /mm ³	10,4 (4,6)	10,7 (4,2)	10,1 (5,2)	8,3 (5,5)

DE: desviación estándar; PCR: proteína C reactiva.

Globalmente, en los casos de candidemia la cifra de leucocitos y PCR es más alta respecto a los controles, pero sin alcanzar significación estadística. Por otro lado, los niveles de PCR se encuentran significativamente más elevados en las candidemias por *C. albicans* respecto a los casos producidos por otras especies de *Candida* ($P = 0,03$).

3. Análisis de la expresión de miARN mediante NGS

En este apartado se describen los miARN identificados mediante las técnicas de secuenciación masiva. De acuerdo a lo descrito en los métodos, se ha comparado la expresión de dichas moléculas entre 3 distintos grupos, candidemia por *C. albicans*, candidemia por especies de *C. no albicans* y controles.

Globalmente, 7 miARN resultaron diferencialmente expresados. En la figura 10 se detalla, mediante un diagrama de Venn, el número de los miARN detectados en las distintas comparaciones.

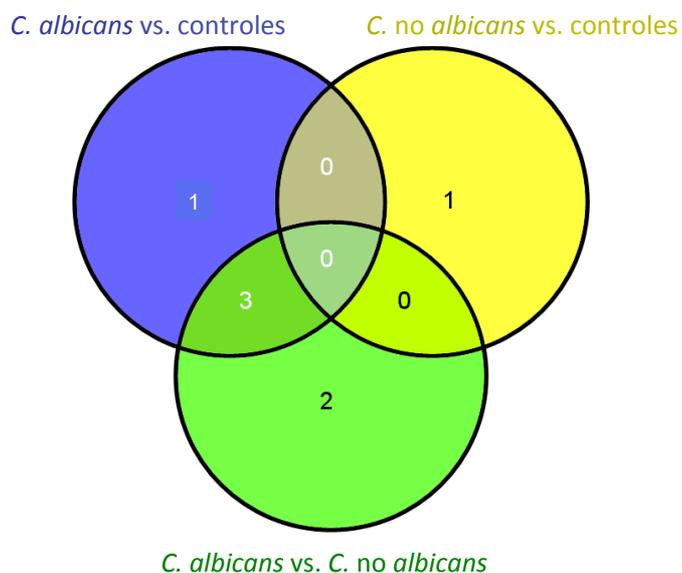


Figura 10. Diagrama de Venn de los miARN diferencialmente expresados.

3.1. Comparación entre candidemia por *C. albicans* y controles

La comparación entre las muestras procedentes de candidemia por *C. albicans* y controles ha llevado a la identificación de 4 miARN diferencialmente expresados entre estos grupos (tabla 11).

Tabla 11. Expresión diferencial de miARN entre los casos de candidemia por *C. albicans* y el grupo control.

miARN	<i>Fold Change</i>	<i>P</i>	<i>P</i> ajustada
miR-99b	2,684	<0,001	<0,001
miR-125a	2,432	<0,001	<0,001
miR-5690	2,396	0,003	0,176
miR-584	-2,155	0,005	0,176

Como se observa en la segunda columna de la tabla, donde se muestra el *fold change*, o medida relativa de la expresión diferencial entre los dos grupos, todos los miARN excepto miR-584 mostraron una sobreexpresión en casos frente a controles (signo positivo). En las últimas dos columnas, se reporta la significación estadística de la expresión diferencial. Como ya se ha mencionado en el apartado de material y métodos, ya que el análisis estadístico realizado conllevaba múltiples comparaciones, se ha obtenido un valor de la *P* ajustado mediante el método del *False Discovery Rate* (FDR).

Por tanto, tres miARN resultan sobreexpresados en los pacientes con candidemia por *C. albicans* respecto a los controles: miR-99b, miR-125a, miR-5690, mientras que miR-584 se muestra infraexpresado en los casos. La

expresión diferencial de dichas moléculas se mantiene estadísticamente significativa tras ajuste por el método del FDR sólo en el caso de miR-99b y miR-125a.

3.2. Comparación entre candidemia por *C. no albicans* y controles

La comparación entre las muestras procedentes de candidemia por especies de *C. no albicans* y controles ha llevado a la identificación de 1 miARN diferencialmente expresado que se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Expresión diferencial de miARN entre los casos de candidemia por *C. no albicans* y el grupo control.

miARN	<i>Fold Change</i>	<i>P</i>	<i>P</i> ajustada
miR-144	-3,298	<0,001	0,126

Así, miR-144 resulta infraexpresado en los casos de candidemia por especies de *C. no albicans* respecto a los controles, aunque esta diferencia en la expresión pierde significación estadística tras ajuste por FDR.

3.3. Comparación entre candidemia por *C. albicans* y *C. no albicans*

La comparación entre las muestras procedentes de candidemia por *C. albicans* y por especies de *C. no albicans* ha llevado a la identificación de 5 miARN diferencialmente expresados que se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Expresión diferencial de miARN entre los casos de candidemia por *C. albicans* y *C. no albicans*.

miARN	<i>Fold Change</i>	<i>P</i>	<i>P</i> ajustada
miR-99b	2,477	<0,001	0,001
miR-125a	2,298	<0,001	0,002
miR-5690	2,366	0,004	0,186
let-7a	-1,991	<0,001	0,010
miR-223	-1,929	0,004	0,186

Tres miARN resultan sobreexpresados en las candidemias por *C. albicans* respecto a las producidas por otras especies de *Candida*: miR-99b, miR-125a y miR-5690. Por otro lado, se encuentra una mayor expresión de let-7a y miR-223 en los casos de candidemia por especies de *C. no albicans*. Dichas diferencias mantienen significación estadística tras el ajuste por FDR para miR-99b, miR-125a y let-7a.

4. Análisis de la expresión de miARN específicos mediante qPCR

4.1. Análisis de la expresión de miR-99b

Los resultados del análisis de la expresión de miR-99b mediante qPCR se muestran en las figuras 11 y 12. Se detalla la expresión de este miARN en los pacientes con candidemia por *C. albicans* respecto a los controles (figura 11) y respecto a los pacientes con candidemia por especies de *C.* no *albicans* (figura 12).

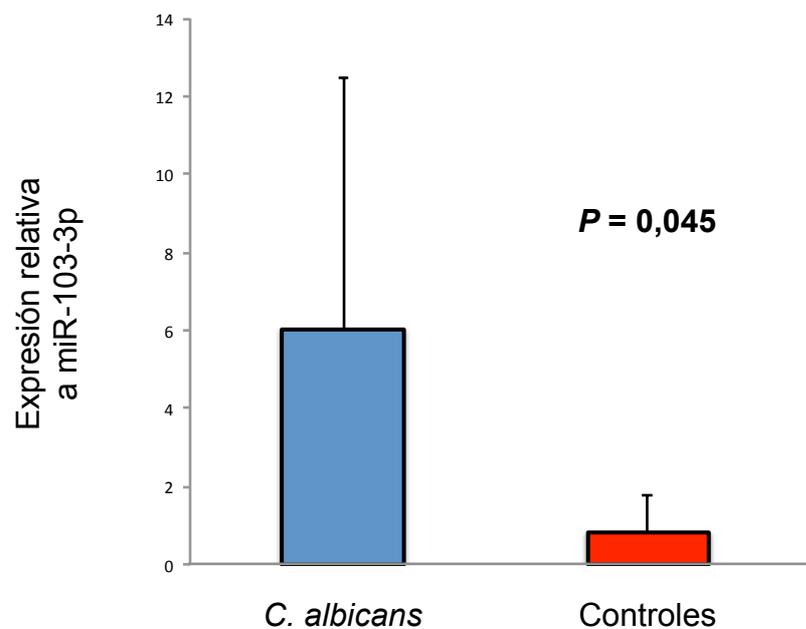


Figura 11. Expresión relativa de miR-99b en pacientes con candidemia por *C. albicans* y controles.

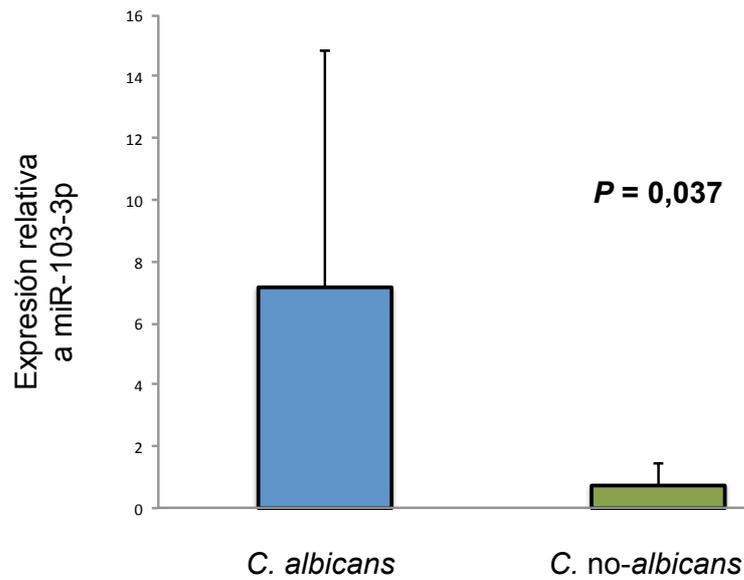


Figura 12. Expresión relativa de miR-99b en pacientes con candidemia por *C. albicans* y por especies de *C. no albicans*.

Por tanto, miR-99b se encuentra significativamente sobreexpresado en pacientes con candidemia por *C. albicans*, tanto respecto a los controles (figura 11), como respecto a los casos producidos por especies de *C. no albicans* (figura 12).

4.2. Análisis de la expresión de miR-125a

Los resultados del análisis de la expresión de miR-125a se muestran en las figuras 13 y 14.

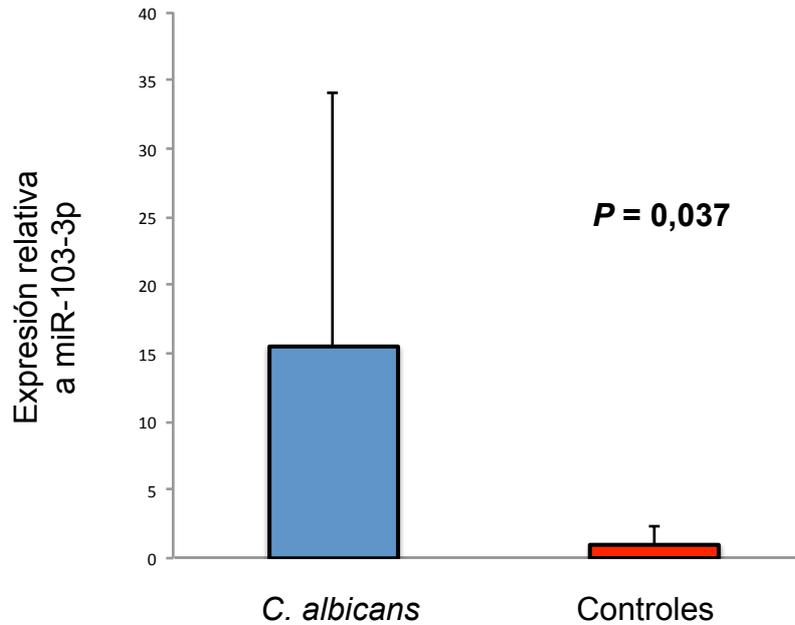


Figura 13. Expresión relativa de miR-125a en pacientes con candidemia por *C. albicans* y controles.

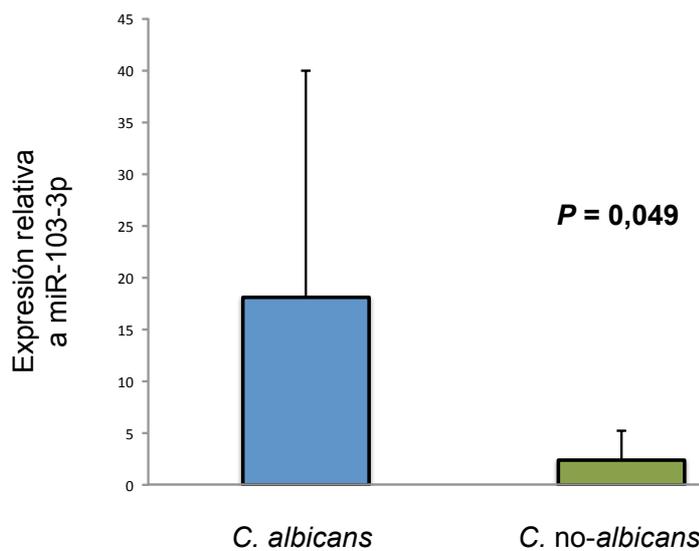


Figura 14. Expresión relativa de miR-125a en pacientes con candidemia por *C. albicans* y por especies de *C. no albicans*.

Como puede observarse, miR-125a se encuentra significativamente sobreexpresado en pacientes con candidemia por *C. albicans*, tanto respecto a los controles (figura 13), como respecto a los casos producidos por especies de *C. no albicans* (figura 14).

4.3. Análisis de la expresión de miR-5690

Los resultados del análisis de la expresión de miR-5690 se muestran en las figuras 15 y 16. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miR-5690 en los pacientes con candidemia por *C. albicans*, ni respecto a controles (figura 15) ni respecto a los casos por especies de *C. no albicans* (figura 16).

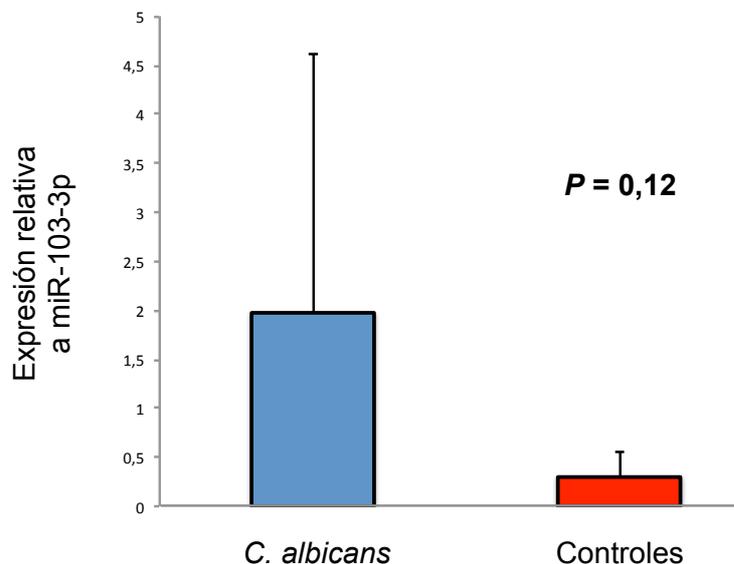


Figura 15. Expresión relativa de miR-5690 en pacientes con candidemia por *C. albicans* y controles.

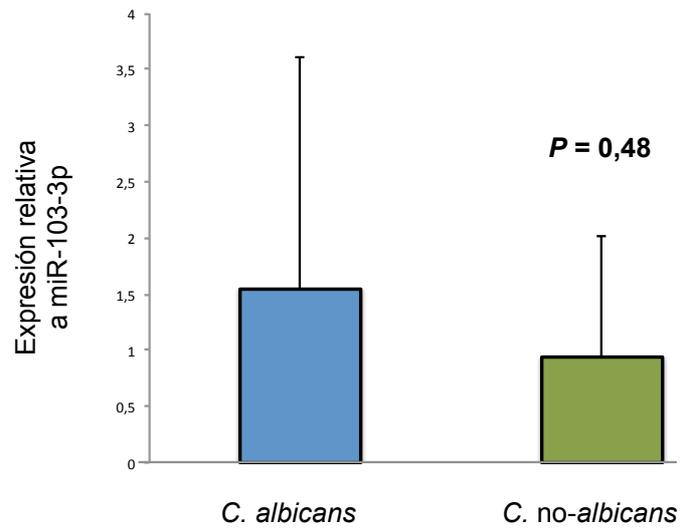


Figura 16. Expresión relativa de miR-5690 en pacientes con candidemia por *C. albicans* y por especies de *C. no albicans*.

4.4. Análisis de la expresión de miR-584

Los resultados obtenidos al analizar la expresión de miR-584 en pacientes con candidemia por *C. albicans* y controles se muestran en la figura 17. No hay diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miR-584 ($P = 0,31$).

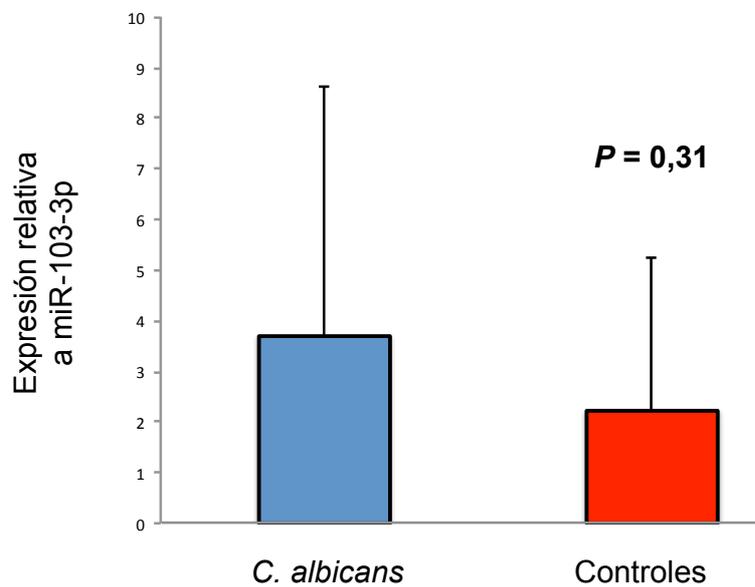


Figura 17. Expresión relativa de miR-584 en pacientes con candidemia por *C. albicans* y controles.

4.5. Análisis de la expresión de miR-144

Los resultados del análisis de la expresión de miR-144 se muestran en las figuras 18 y 19. Puede observarse que miR-144 resulta significativamente infraexpresado entre las candidemias por especies de *C. no albicans*, tanto frente a controles (figura 18) como frente a candidemia por *C. albicans* (figura 19).

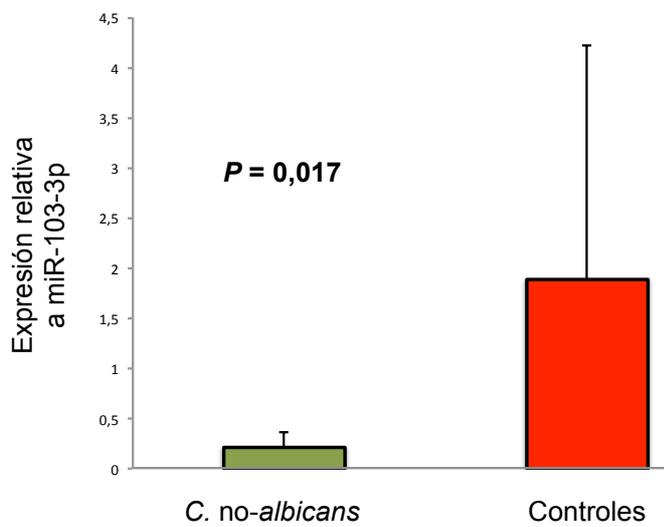


Figura 18. Expresión relativa de miR-144 en pacientes con candidemia por especies de *C. no albicans* y controles.

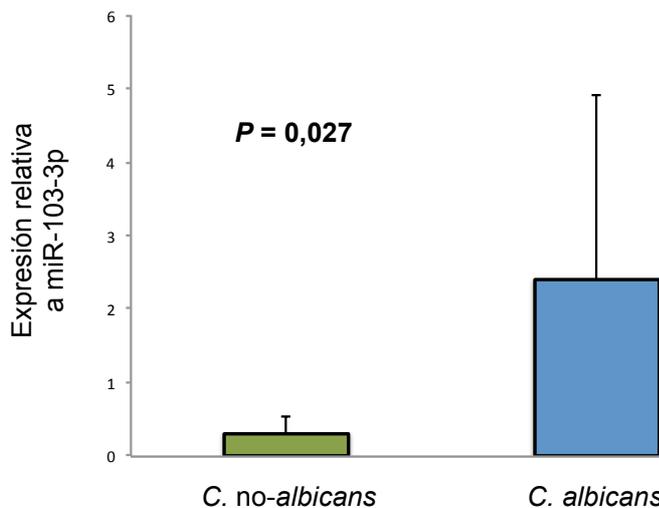


Figura 19. Expresión relativa de miR-144 en pacientes con candidemia por *C. no albicans* y por *C. albicans*.

4.6. Análisis de la expresión de let-7a

Los resultados obtenidos al analizar la expresión de let-7a en pacientes con candidemia por *C. albicans* y pacientes con candidemia por especies de *C.* no *albicans* se muestran en la figura 20. No se evidencian diferencias estadísticamente significativas en la expresión de let-7a ($P = 0,41$).

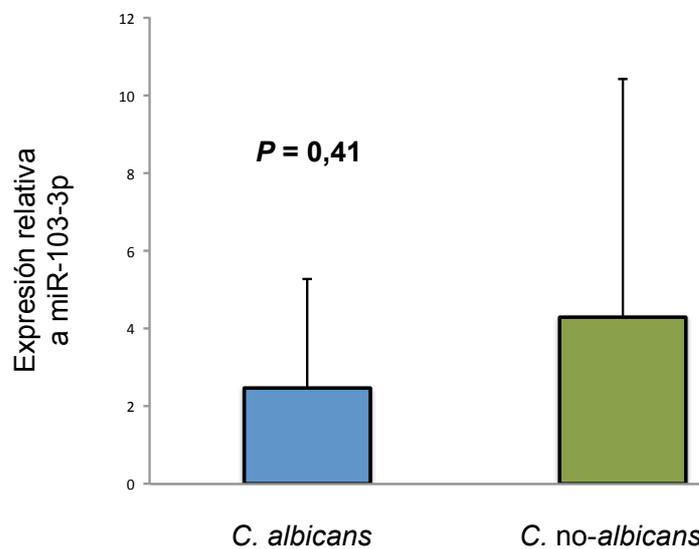


Figura 20. Expresión relativa de let-7a en pacientes con candidemia por *C. albicans* y por especies de *C. no albicans*.

4.7. Análisis de la expresión de miR-223

Los resultados obtenidos al analizar la expresión de miR-223 en pacientes con candidemia por *C. albicans* y pacientes con candidemia por especies de *C. no albicans* se muestran en la figura 21. La expresión de miR-223 es mayor entre los casos por *C. albicans*, pero sin alcanzar significación estadística ($P = 0,054$).

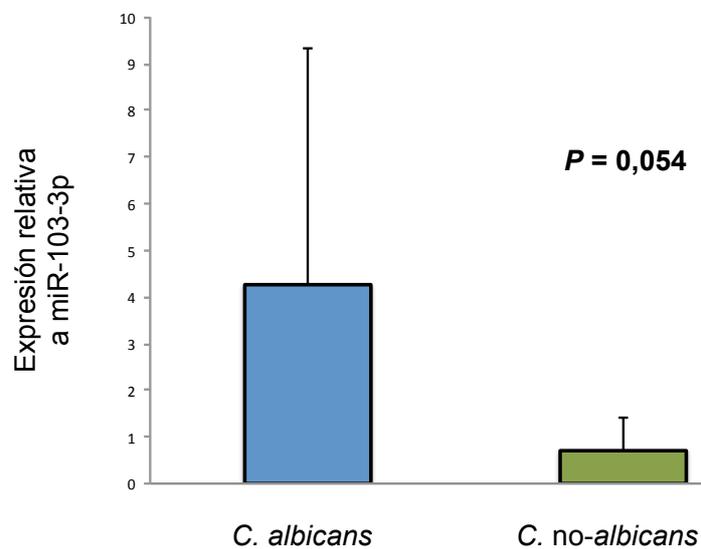


Figura 21. Expresión relativa de miR-223 en pacientes con candidemia por *C. albicans* y por especies de *C. no albicans*.

4.8. Resumen de la expresión diferencial de miARN específicos

El perfil de expresión de los miARN analizados en los diferentes grupos estudiados se resume en la tabla 14. Se muestran sombreados los resultados significativos tras el análisis confirmatorio mediante qPCR.

Tabla 14. Expresión diferencial de miARN específicos.

miARN		NGS	qPCR
miR-99b	CA vs. controles	Incremento ($P < 0,001$)*	Incremento ($P = 0,045$)
	CA vs. CNA	Incremento ($P = 0,001$)*	Incremento ($P = 0,037$)
miR-125a	CA vs. controles	Incremento ($P < 0,001$)*	Incremento ($P = 0,037$)
	CA vs. CNA	Incremento ($P = 0,002$)*	Incremento ($P = 0,049$)
miR-5690	CA vs. controles	Incremento ($P = 0,003$)	NS ($P = 0,12$)
	CA vs. CNA	Incremento ($P = 0,004$)	NS ($P = 0,48$)
miR-584	CA vs. controles	Disminución ($P = 0,005$)	NS ($P = 0,31$)
miR-144	CNA vs. controles	Disminución ($P < 0,001$)	Disminución ($P = 0,017$)
	CNA vs. CA	NS ($P = 0,357$)	Disminución ($P = 0,027$)
let-7a	CA vs. CNA	Disminución ($P = 0,010$)*	NS ($P = 0,41$)
miR-223	CA vs. CNA	Disminución ($P = 0,004$)	NS ($P = 0,054$)

* P ajustada (FDR). CA: candidemia por *C. albicans*; CNA: candidemia por *C. no albicans*. NS: no significativo.

En síntesis, se comprueban los resultados del análisis de NGS mediante qPCR para 3 de los 7 miARN identificados. De esta forma, miR-99b y miR-125a resultan sobreexpresados en candidemia por *C. albicans*, mientras que miR-144 se encuentra infraexpresado en candidemia por especies de *C. no albicans*.

5. Correlación entre la expresión de miARN específicos y marcadores inflamatorios

En este apartado se evalúa la relación de la expresión de los miARN con la respuesta inflamatoria medida mediante los marcadores inflamatorios disponibles en el grupo experimental (leucocitos y PCR).

5.1. Correlación entre miR-99b y marcadores inflamatorios

En la figura 22 se muestra la correlación entre la expresión de miR-99b y los marcadores inflamatorios en la población total, que incluye casos y controles.

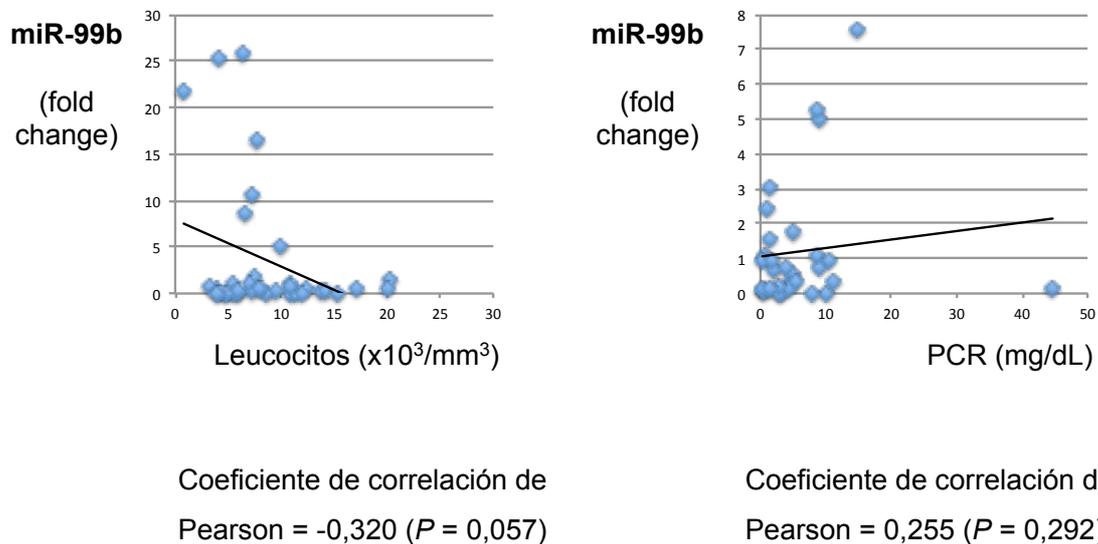


Figura 22. Correlación entre la expresión de miR-99b y las cifras de leucocitos y PCR en el grupo global.

Como puede observarse, existe una correlación negativa que se aproxima a la significación estadística entre la cifra de los leucocitos y la expresión de miR-99b. Por otro lado, no existe correlación significativa entre el valor de la PCR y la expresión de miR-99b.

Ya que la correlación entre la cifra de leucocitos y la expresión de miR-99b se encuentra al límite de la significación estadística, se ha repetido este análisis agrupando los pacientes en base al número de leucocitos, usando como punto de corte el percentil 50. Se ha comparado entonces la expresión de miR-99b en los dos grupos así obtenidos. El resultado de este análisis se muestra en la figura 23.

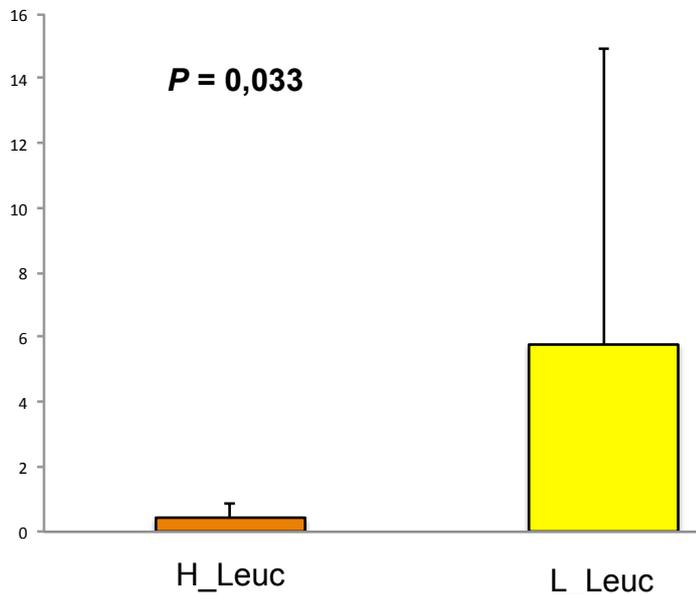


Figura 23. Análisis de la expresión de miR-99b en el grupo con mayor (H_Leuc) y menor (L_Leuc) recuento leucocitario.

En este análisis se confirmó que la expresión de miR-99b es significativamente mayor en el grupo de pacientes con menor recuento leucocitario. También se ha evaluado la correlación con los marcadores inflamatorios en el grupo de los casos. El resultado de este análisis se muestra en la figura 24.

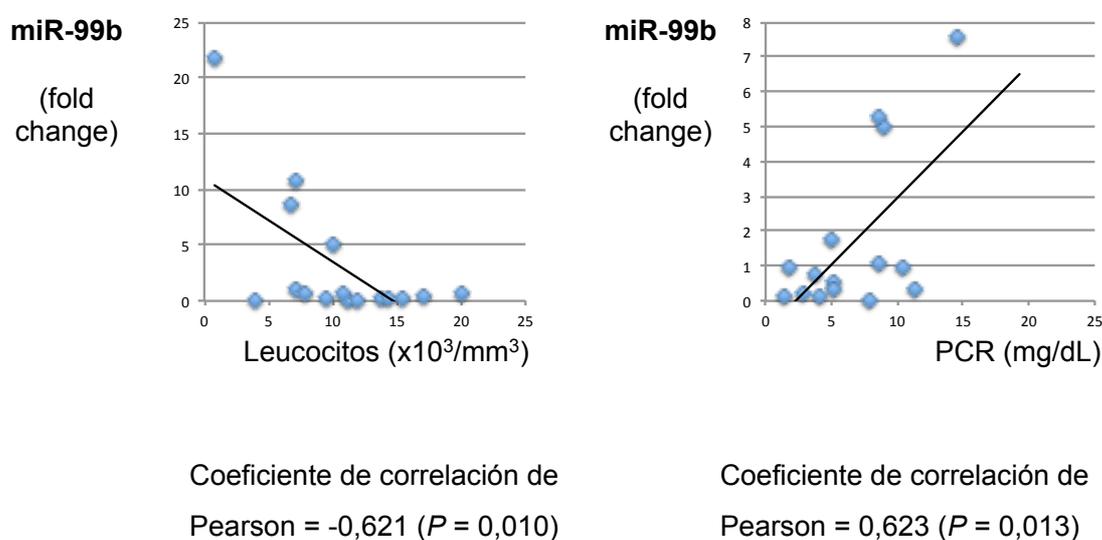


Figura 24. Correlación entre la expresión de miR-99b y las cifras de leucocitos y PCR en el grupo de los casos.

En los pacientes con candidemia, existe una correlación negativa, estadísticamente significativa, entre el recuento de leucocitos y la expresión de miR-99b. Por otro lado, a mayor valor de la PCR, miR-99b se encuentra significativamente más expresado. En cambio, considerando solo el grupo de controles, no se evidencian correlaciones significativas entre la expresión de miR-99b y las cifras de leucocitos y/o PCR.

5.2. Correlación entre miR-125a y marcadores inflamatorios

En la figura 25 se muestra la correlación entre la expresión de miR-125a y los marcadores inflamatorios en la población total, que incluye casos y controles.

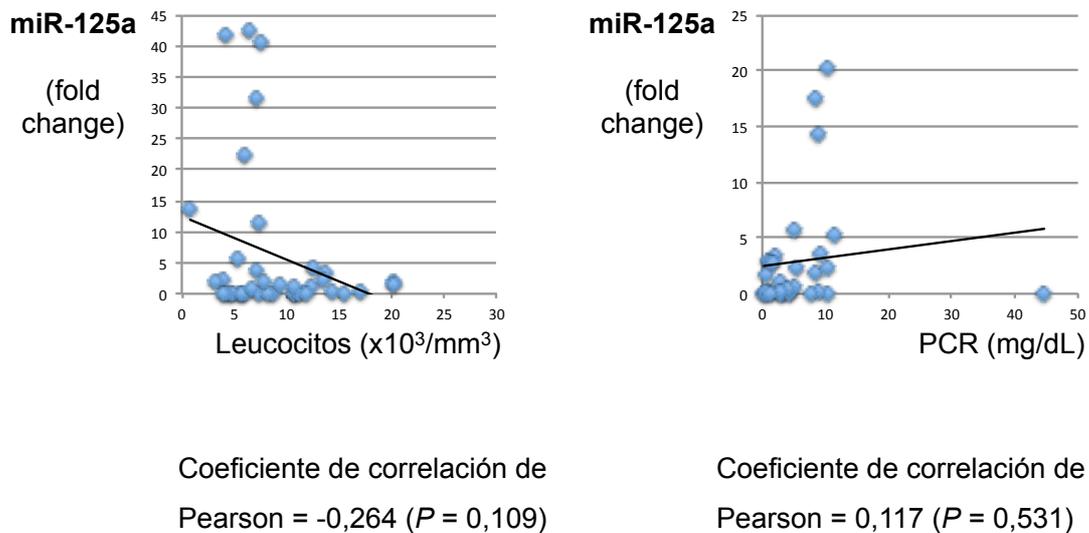


Figura 25. Correlación entre la expresión de miR-125a y las cifras de leucocitos y PCR en el grupo global.

Existe una correlación negativa entre el recuento de leucocitos y la expresión de miR-125a, que no alcanza significación estadística. En cambio, no hay correlación significativa entre la PCR y la expresión de miR-125a. Como en el caso de miR-99b, hemos comparado también la expresión de miR-125a en dos grupos obtenidos en base al recuento leucocitario, empleando como punto de corte el percentil 50. Los resultados se muestran en la figura 26.

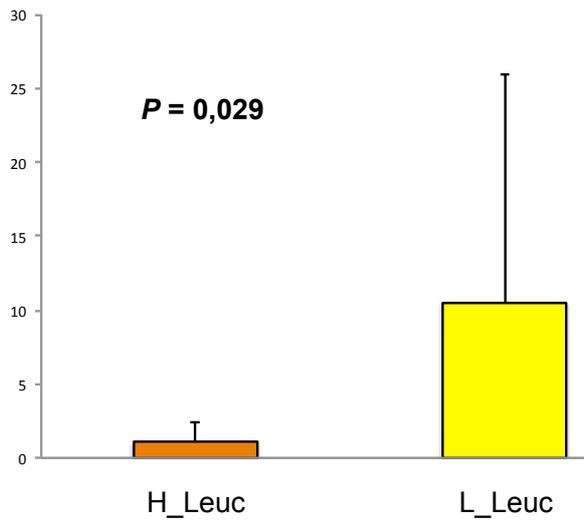
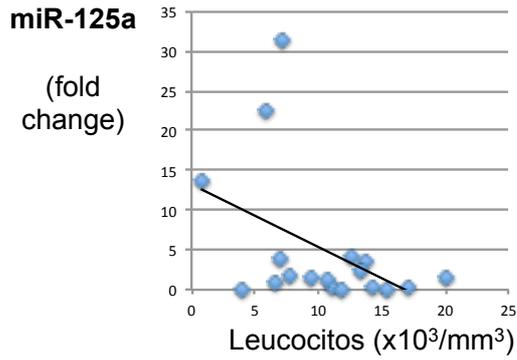
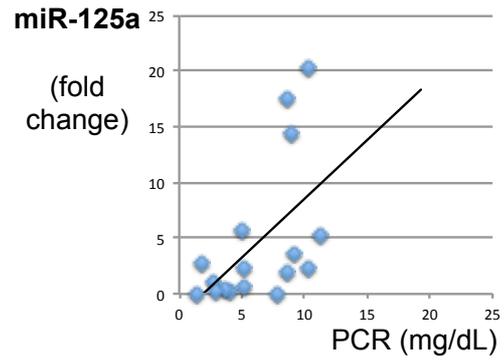


Figura 26. Análisis de la expresión de miR-125a en el grupo con mayor (H_Leuc) y menor (L_Leuc) recuento leucocitario.

La expresión de miR-125a resulta significativamente mayor en el grupo con menor recuento leucocitario. Tomando en consideración solamente el grupo de los casos, se confirma la tendencia a la correlación negativa entre el recuento leucocitario y la expresión de miR-125a, mientras que se evidencia una correlación positiva con la PCR. A mayor valor de este marcador inflamatorio, mayor es la expresión de miR-125a (figura 27).



Coeficiente de correlación de Pearson = -0,439 ($P = 0,068$)



Coeficiente de correlación de Pearson = 0,535 ($P = 0,027$)

Figura 27. Correlación entre la expresión de miR-125a y las cifras de leucocitos y PCR en el grupo de los casos.

En el grupo de controles, no se evidencian correlaciones estadísticamente significativas entre sus niveles de expresión y las cifras de leucocitos y/o PCR.

5.3. Correlación entre miR-144 y marcadores inflamatorios

En la figura 28 se muestra la correlación entre la expresión de miR-144 y los marcadores inflamatorios en la población total, que incluye casos y controles.

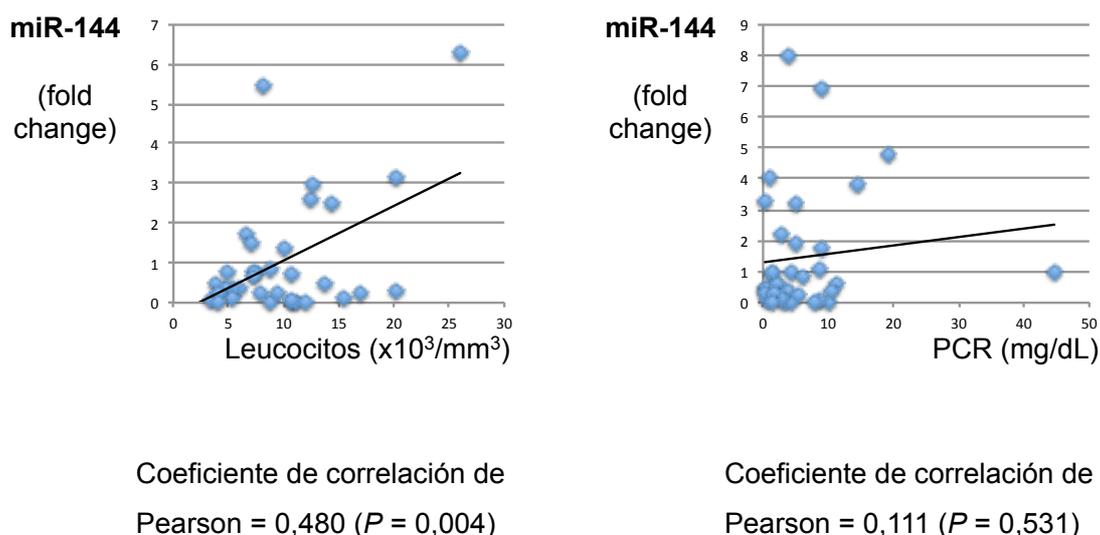
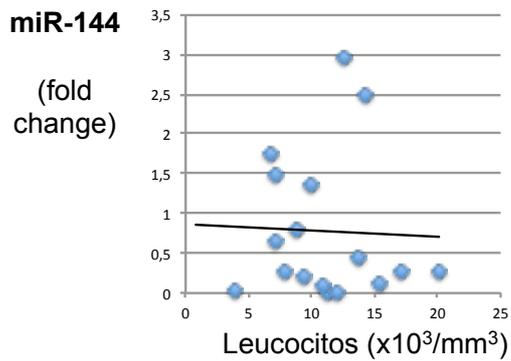
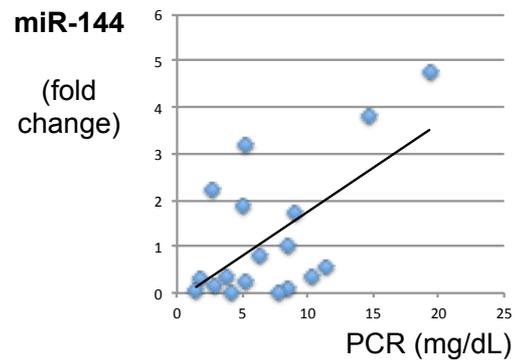


Figura 28. Correlación entre la expresión de miR-144 y las cifras de leucocitos y PCR en el grupo global.

No se evidencia correlación entre la expresión de miR-144 y la PCR, mientras que sí existe una correlación directa y significativa con el recuento leucocitario: a mayor recuento leucocitario más expresado se encuentra miR-144. Al analizar únicamente el grupo de casos, estos resultados no se confirman (figura 29). Así, en los pacientes con candidemia, no se demuestra la existencia de correlación entre recuento leucocitario y expresión de miR-144. Por otro lado, los valores de PCR se correlacionan positivamente y de forma significativa con la expresión de este miARN.



Coefficiente de correlación de Pearson = -0,035 ($P = 0,894$)



Coefficiente de correlación de Pearson = 0,615 ($P = 0,007$)

Figura 29. Correlación entre la expresión de miR-144 y las cifras de leucocitos y PCR en el grupo de casos.

Al analizar solamente el grupo de los controles, existe una correlación positiva significativa entre la expresión de miR-144 y el recuento leucocitario ($r = 0,741$; $P = 0,001$), mientras que no hay correlación con la cifra de PCR (tabla 15).

5.4. Resumen de la relación entre miARN y marcadores inflamatorios

Los principales resultados del análisis de la relación entre expresión de miARN y niveles de marcadores inflamatorios se resumen en la tabla 15. Se muestran sombreados los resultados estadísticamente significativos.

Tabla 15. Correlación entre miARN y marcadores inflamatorios.

miARN (fold change)		Leucocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	PCR (mg/dL)
miR-99b	Grupo global	$r = -0,320$ ($P = 0,057$)	$r = 0,255$ ($P = 0,292$)
	Casos	$r = -0,621$ ($P = 0,010$)	$r = 0,623$ ($P = 0,013$)
	Controles	$r = -0,134$ ($P = 0,573$)	$r = -0,243$ ($P = 0,382$)
miR-125a	Grupo global	$r = -0,264$ ($P = 0,109$)	$r = 0,117$ ($P = 0,531$)
	Casos	$r = -0,439$ ($P = 0,068$)	$r = 0,535$ ($P = 0,027$)
	Controles	$r = -0,146$ ($P = 0,539$)	$r = -0,243$ ($P = 0,382$)
miR-144	Grupo global	$r = 0,480$ ($P = 0,004$)	$r = 0,111$ ($P = 0,531$)
	Casos	$r = -0,035$ ($P = 0,894$)	$r = 0,615$ ($P = 0,007$)
	Controles	$r = 0,741$ ($P = 0,001$)	$r = -0,007$ ($P = 0,981$)

r = Coeficiente de correlación de Pearson.

Se evidencia una tendencia a la correlación negativa entre el recuento leucocitario y la expresión de miR-99b y miR-125a, tanto en el conjunto de la muestra como en el grupo de los casos, aunque débil o sin alcanzar significación estadística. Se comporta de manera distinta miR-144: su expresión se correlaciona positivamente con el recuento leucocitario en el grupo global, pero esta relación no se aprecia en la cohorte de los casos.

En cuanto a la PCR, no se evidencia correlación con la expresión de los miARN en el grupo global, sin embargo, cuando se analiza la cohorte de los casos, se demuestra una correlación positiva con la expresión de los 3 miARN evaluados.

En relación con el resto de miARN, los resultados se muestran en la tabla 16, sin que haya correlaciones significativas en ninguna de las comparaciones realizadas.

Tabla 16. Correlación entre los otros miARN y los marcadores inflamatorios (grupo global).

miARN (fold change)	Leucocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	PCR (mg/dL)
miR-5690	$r = -0,016$ ($P = 0,938$)	$r = 0,009$ ($P = 0,965$)
miR-584	$r = -0,112$ ($P = 0,535$)	$r = 0,207$ ($P = 0,264$)
let-7a	$r = 0,020$ ($P = 0,902$)	$r = 0,026$ ($P = 0,879$)
miR-223	$r = 0,045$ ($P = 0,807$)	$r = -0,049$ ($P = 0,798$)

r = Coeficiente de correlación de Pearson.

6. Relación entre la expresión de miARN específicos y evolución clínica de los pacientes

Para evaluar la posible relación entre la evolución clínica de los pacientes con candidemia y los miARN cuya expresión diferencial se ha comprobado en los casos, se ha usado como principal parámetro evolutivo la mortalidad a 30 días. Sin embargo dado el bajo número de eventos en la cohorte experimental, se han considerado también otras variables evolutivas, tales como el desarrollo de shock séptico relacionado con la candidemia y la necesidad de ingreso en una Unidad de Cuidados Intensivos.

6.1. Relación entre miR-99b y evolución clínica

En la cohorte de los pacientes con candidemia, 3 pacientes fallecieron durante los primeros 30 días de seguimiento. En la figura 30 se compara el nivel de expresión relativa de miR-99b entre los pacientes fallecidos y los supervivientes.

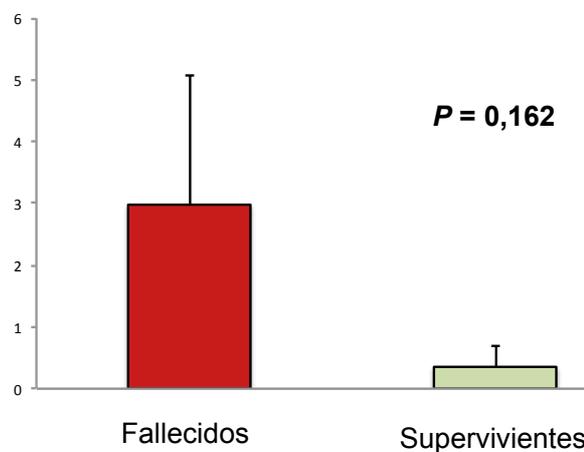


Figura 30. Análisis comparativo de la expresión de miR-99b en el grupo de fallecidos y supervivientes.

La expresión de miR-99b es mayor entre los pacientes fallecidos, aunque el resultado no es significativo. Posteriormente hemos agrupado la cohorte de pacientes con candidemia en función de las variables evolutivas mencionadas anteriormente, comparando así la expresión de este miARN en pacientes con mala evolución clínica (shock en la evolución y/o ingreso en UCI y/o fallecimiento a los 30 días) frente al resto de casos de candidemia. Tras realizar este análisis, la expresión de miR-99b resultaba mayor en el grupo con peor evolución clínica, pero sin alcanzar la significación estadística (figura 31).

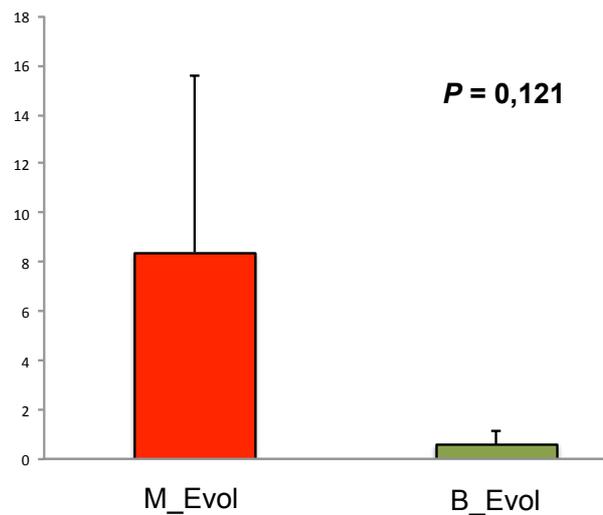


Figura 31. Análisis comparativo de la expresión de miR-99b en el grupo con mala (M_Evol) y buena evolución clínica (B_Evol).

6.2. Relación entre miR-125a y evolución clínica

En la figura 32 se compara el nivel de expresión relativa de miR-125a entre los pacientes fallecidos y los supervivientes.

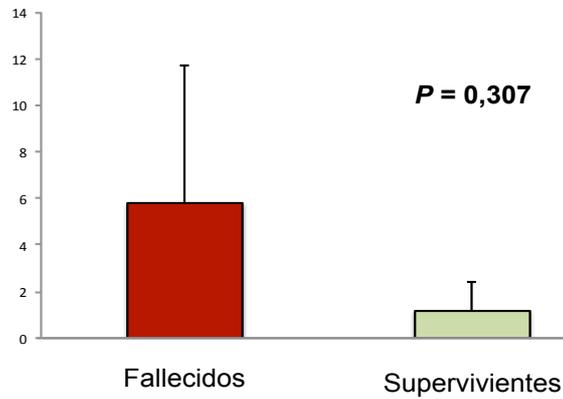


Figura 32. Análisis comparativo de la expresión de miR-125a en el grupo de fallecidos y supervivientes.

La expresión de miR-125a es mayor entre los pacientes fallecidos, pero de forma no significativa. Agrupando los pacientes en base a peor o mejor evolución clínica, tampoco se obtienen resultados significativos (figura 33).

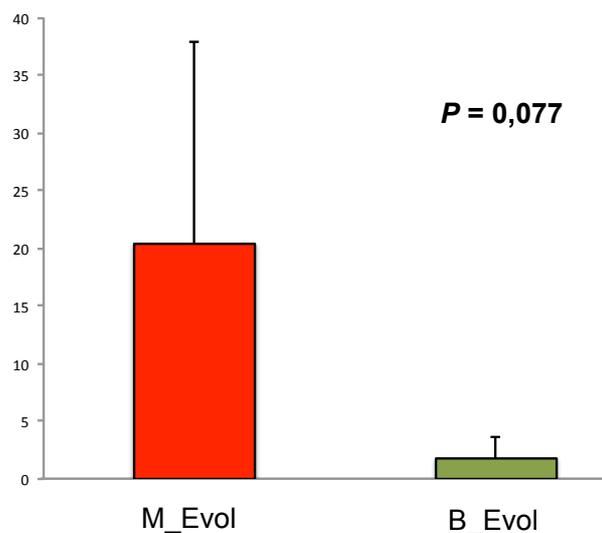


Figura 33. Análisis comparativo de la expresión de miR-125a en el grupo con mala (M_Evol) y buena evolución clínica (B_Evol).

6.3. Relación entre miR-144 y evolución clínica

No se evidencian diferencias significativas en la expresión relativa de miR-144 entre los pacientes fallecidos y los supervivientes (figura 34).

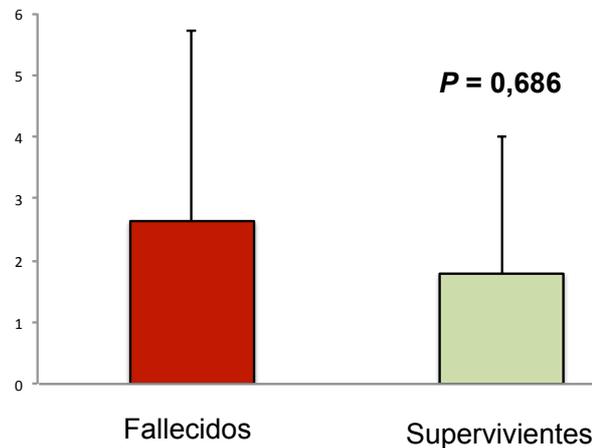


Figura 34. Análisis comparativo de la expresión de miR-144 en el grupo de fallecidos y supervivientes.

Agrupando los pacientes de acuerdo a las variables evolutivas, la expresión de miR-144 resulta mayor en el grupo con peor evolución clínica, de forma no significativa (figura 35).

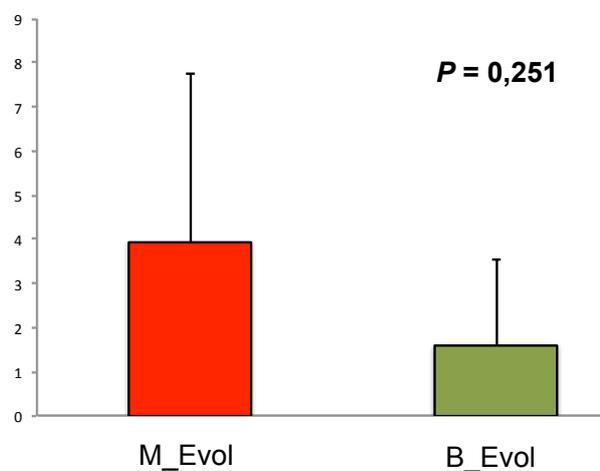


Figura 35. Análisis comparativo de la expresión de miR-144 en el grupo con mala (M_Evol) y buena evolución clínica (B_Evol).

V. DISCUSIÓN

En nuestro estudio, miR-99b y miR-125a resultan significativamente sobreexpresados en la candidemia por *C. albicans*, y miR-144 se encuentra infraexpresado en los casos con infección por *C. no albicans*. Este es el primer trabajo que relaciona la expresión de determinados miARN con la presencia de candidemia, lo que puede permitir progresar desde el punto de vista diagnóstico y pronóstico en el manejo de esta enfermedad.

La candidemia, como se evidencia en el registro epidemiológico de nuestro hospital, es una infección nosocomial que va cobrando creciente relevancia también en los servicios médicos. El dato más relevante desde el punto de vista epidemiológico, en línea con lo descrito en la literatura (30, 67), es aquel relativo a la tasa de mortalidad: aproximadamente uno de cada 3 pacientes con candidemia fallece durante los primeros 30 días de seguimiento. Al menos en parte, el elevado porcentaje de desenlace fatal es debido al bajo grado de sospecha de la etiología fúngica y al retraso diagnóstico. Esto se traduce, por un lado, en que el tratamiento empírico resulta acertado sólo en una minoría de los casos; por otro lado, cuando se reciben los primeros resultados microbiológicos es a menudo ya demasiado tarde para instaurar un tratamiento dirigido. En este sentido, los resultados de este trabajo podrían contribuir a mejorar el manejo de la candidemia permitiendo un diagnóstico más precoz en caso de confirmar que los miARN detectados en nuestro estudio pueden servir de biomarcadores de infección invasiva por *Candida*.

1. Expresión diferencial de miARN en pacientes con candidemia

Los miARN son pequeñas moléculas implicadas en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional (72). Intervienen en distintos procesos celulares, como la diferenciación, la proliferación, la inflamación y la respuesta inmunitaria (76). La importancia del delicado equilibrio en la expresión de los miARN ha recibido gran atención por la comunidad científica en la última década y su papel ha sido estudiado en distintos contextos clínicos, fisiológicos y patológicos, tanto *in vitro* como *in vivo* (76). La mayoría de los trabajos se han centrado en el papel de los miARN en el campo de la oncología (114). En el ámbito de las enfermedades infecciosas, los descubrimientos más relevantes en el campo del miARN se han llevado a cabo en el estudio de pacientes con infección por virus hepatotropos (78, 79). Se han realizado en este sentido diversos estudios que identifican la expresión de miARN en respuesta a la infección por patógenos concretos, como *Pseudomonas aeruginosa* (115) o *Salmonella enterica* (116), así como análisis del perfil de expresión diferencial en la infección producida en modelos celulares por una bacteria Gram positiva como *S. aureus* y otra Gram negativa como *E. coli* (117). Se han publicado también investigaciones que resaltan el rol de la expresión de algunos miARN como marcadores diagnósticos y pronósticos de la sepsis (85-87). En los trabajos señalados no se hace referencia a pacientes con sepsis por *Candida* u otros patógenos fúngicos por lo que este estudio es el primero que evidencia la expresión diferencial de estas moléculas en pacientes con candidemia. Un trabajo anterior, publicado en 2010 (90), muestra cómo la exposición de macrófagos murinos a *C. albicans* determina un perfil de expresión específico de miARN en este tipo

celular, siendo la única evidencia previa de que variaciones en la concentración de algunos miARN pueden tener influencia en la respuesta inmunitaria a los patógenos fúngicos. Este estudio es de gran interés y realizaremos una comparación de nuestros resultados con los hallazgos de este trabajo, pero es importante mencionar que se ha realizado *in vitro* sobre macrófagos murinos y que los patógenos empleados son cepas de *C. albicans* inactivadas con el calor. Por todo ello, incluyendo que el tratamiento con el calor puede modificar los ligandos expuestos en la superficie celular, es evidente que los resultados encontrados pueden diferir respecto al perfil de expresión de miARN inducido por *Candida* spp. tras una infección invasiva *in vivo* en humanos como analizamos en nuestro trabajo.

La medición de los miARN en sangre total se ha realizado con dos técnicas ampliamente empleadas en este ámbito experimental, en primer lugar la secuenciación masiva y, posteriormente, la confirmación mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Las dos técnicas concuerdan en mostrar que miR-99b y miR-125a resultan significativamente sobreexpresados en los casos de candidemia por *C. albicans* y que miR-144 resulta infraexpresado en los casos por *C. no albicans*. Sin embargo, con la evidencia disponible actualmente, resulta difícil elaborar una hipótesis que explique la expresión diferencial de estos miARN en pacientes con candidemia.

1.1. hsa-miR-99b-5p

El locus genómico de miR-99b se encuentra en el brazo largo del cromosoma 19. A este nivel, en un intervalo de aproximadamente 1 kb, ha sido identificado un *cluster* de miARN, que incluye también miR-125a y let-7e (90). El papel de miR-99b ha sido estudiado sobre todo en enfermedades tumorales, donde parece actuar como un gen supresor de tumores (118, 119). En muchos de los trabajos publicados (118), la familia de miR-99b resulta involucrada en la vía de señalización intracelular de la tirosina-quinasa. Entre las dianas identificadas de este miARN, la que probablemente desempeña un papel de mayor importancia es mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*). De acuerdo a los datos fisiopatológicos actualmente disponibles, la sobreexpresión de miR-99b regula negativamente la expresión de mTOR (120, 121). Esta vía mTOR, de hecho, está implicada no solamente en la fisiopatología tumoral, sino también en la regulación de algunos de los principales actores de la respuesta inmunitaria. Las vías de señalización dependientes de mTOR son fundamentales para la proliferación y las funciones efectoras de las células *natural killer* (NK), así como de los linfocitos B (122, 123). Respecto a la interacción del organismo humano con los patógenos fúngicos, la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR parece tener un papel importante en la regulación de la respuesta inmunitaria innata: ejerce un efecto citoprotector en los macrófagos tras la fagocitosis de *Aspergillus* spp. (124) y previene el daño inducido en las células epiteliales en caso de infección por *C. albicans* (125). La prevención del daño de la barrera epitelial, mediada por esa vía de señalización, podría ser relevante para evitar la invasión fúngica. Por lo tanto, se podría formular una hipótesis sobre el papel de la sobreexpresión de

miR-99b en la fisiopatología de la candidemia: por un lado, su incremento podría favorecer el daño provocado por los hongos a nivel de la barrera epitelial y facilitar de esta forma la penetración del patógeno en el torrente sanguíneo; por el otro, la regulación negativa de algunos efectores inmunitarios, mediada por la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR, favorecería su proliferación y persistencia en el torrente sanguíneo.

Las evidencias procedentes de modelos preclínicos de otras enfermedades infecciosas apoyan la plausibilidad de esas hipótesis. Por ejemplo, se ha identificado un potencial papel para la familia miR-99 en la replicación del virus de la hepatitis B (VHB). Mediante la regulación negativa de la vía de señalización IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR, los miembros de la familia miR-99 promueven la autofagia que es un proceso clave para la replicación de VHB (81). Otro experimento, realizado en células dendríticas murinas, demuestra como la infección por *Mycobacterium tuberculosis* determina la sobreexpresión de miR-99b, que a su vez, regula negativamente la vía de señalización de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), disminuyendo la producción de citoquinas como Interleuquina (IL)-6, IL-12, IL-1 β . En la práctica, *M. tuberculosis* inhibe la activación de las células infectadas mediante la sobreexpresión de miR-99b, evadiendo de esta forma la respuesta inmune del hospedador (80).

Un trabajo realizado en modelos murinos por Wang *et al.* ha demostrado también el rol de este miARN en la homeostasis del epitelio intestinal: la exposición a LPS incrementó la expresión de miR-99b que a su vez inhibe la expresión del gen MGF-E8, implicado en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. En otras palabras, este estudio sugiere que la sobreexpresión de

miR-99b inducida por LPS podría ser responsable, al menos en parte, de la alteración de la barrera intestinal que se produce en el curso de un proceso séptico (126). Este es un aspecto interesante si pensamos en la fisiopatología de la candidemia. De hecho, *Candida* coloniza frecuentemente el tracto digestivo y la translocación de este microorganismo a nivel intestinal representa una de las puertas de entrada más frecuentes para el desarrollo de esta infección fúngica invasiva. La sobreexpresión de miR-99b encontrada en los pacientes con candidemia por *C. albicans* en nuestro estudio, permite plantear consideraciones fisiopatológicas en ese sentido, que merecería la pena comprobar con estudios funcionales.

1.2. hsa-miR-125a-5p

El locus genómico de miR-125a se encuentra a nivel del brazo largo del cromosoma 19. El perfil de expresión de miR-125a ha sido estudiado ampliamente en diferentes contextos experimentales. Como para la mayoría de los miARN, gran parte de estos estudios se han realizado en enfermedades tumorales (127, 128). Se ha comprobado que miR-125a se comporta como un gen supresor de tumores y su expresión resulta disminuida en varias neoplasias, como el carcinoma hepatocelular, el cáncer gástrico, ovárico y mamario (129-131). Una de las principales dianas de miR-125a en la inhibición de la proliferación celular, es STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), en la vía de señalización JAK2-STAT3 (132).

En el estudio de Monk *et al.* previamente mencionado (90), miR-125a resultó sobreexpresado en macrófagos murinos expuestos a cepas de *C. albicans* inactivadas con el calor. Este resultado concuerda con lo evidenciado en nuestro trabajo, por lo que se refuerza la validez del hallazgo de un incremento de expresión de miR-125a en el contexto de candidemia. Respecto al significado de este hallazgo, es posible formular hipótesis fisiopatológicas en base a trabajos que han investigado el rol de miR-125a en la reacción inmunitaria a otros patógenos. En la respuesta inmunitaria innata, miR-125a parece estar implicado tanto en la activación de las células NK, como en la modulación del perfil de respuesta macrofágica (82, 133). En particular, en este último ámbito, se describen dos tipos de activación macrofágica: la vía clásica, denominada polarización M1, que es activada por citoquinas proinflamatorias y la vía alternativa, polarización M2, que, al contrario, se caracteriza por una regulación negativa de la respuesta inmunitaria y que está implicada en la reparación de los tejidos (82). Es bien conocido que el delicado equilibrio entre citoquinas pro- y antiinflamatorias es crucial en la evolución y en el pronóstico de los casos de sepsis (134). Así mismo, la expresión de distintas familias de miARN es fundamental en este equilibrio y, entre otros efectos, incide también sobre el tipo de activación macrofágica. Concretamente, se ha demostrado que miR-125a, actuando sobre KLF-4 (*Kruppel-Like Factor 4*), inhibe la polarización M1 y promueve la polarización M2 de los macrófagos (82). La sobreexpresión de miR-125a se traduce en la disminución de la actividad microbicida macrofágica y en el aumento de la actividad fagocítica sobre células apoptóticas (135). En el caso de la infección por *C. albicans*, la sobreexpresión

de miR-125a podría conllevar por lo tanto una mayor permisividad del huésped hacia el desarrollo y la persistencia de una infección invasiva.

En otras enfermedades infecciosas también se ha mostrado un rol para este miARN. Varios trabajos han medido así la expresión de miR-125a en el contexto de la infección por VHB (136, 137). Se ha demostrado que este miARN, cuya concentración se relaciona directamente con la carga viral, interactúa con la secuencia viral. Esta interacción, si por un lado representa un mecanismo de defensa del hospedador, por el otro, podría ser aprovechada también por el virus para establecer una infección persistente (136). De hecho, en el trabajo de Coppola *et al.*, miR-125a representa un predictor independiente de progresión de la enfermedad hepática (136).

1.3. hsa-miR-144-5p

El locus genómico de miR-144 se encuentra a nivel del brazo largo del cromosoma 17. Ha sido reconocido en varios estudios como una molécula con función de supresor de tumores (138, 139). Son pocos los trabajos publicados en el ámbito de las enfermedades infecciosas con este miARN y hasta la fecha no hay evidencia de su implicación en infecciones fúngicas invasivas. Un estudio reciente realizado en un modelo de infección por virus de la gripe en células epiteliales de pulmón murino, sugiere el papel de miR-144 como regulador negativo en la respuesta inmune antiviral del hospedador. En estos experimentos, la expresión de miR-144 se asoció a una reducción de la

producción de citoquinas proinflamatorias y a un aumento de la carga viral en las células infectadas (140).

En otros trabajos se ha evaluado la expresión de este miARN en relación con la infección por *M. tuberculosis*: miR-144 estaba sobreexpresado, tanto en suero como en esputo, en pacientes con tuberculosis y sus niveles se reducían tras tratamiento tuberculostático (141). La expresión de este miARN podría, por tanto, regular negativamente la autofagia a nivel de monocitos y macrófagos, lo que favorecería la proliferación de la micobacteria (142).

El sentido de la alteración de este miARN en los trabajos mencionados es por tanto de signo opuesto respecto al que hemos encontrado en nuestro estudio, por lo que resulta difícil explicar a la luz de estos datos el descenso de miR-144 encontrado en pacientes con candidemia por especies de *C. no albicans*. Nuestros resultados sí están en línea con el estudio de Keller *et al.* publicado en 2014 (143), que examinó el perfil de expresión de los miARN mediante *microarray* en más de 1000 pacientes con 19 patologías distintas (sin incluir procesos infecciosos). De esta forma identificaron distintos miARN, cuyo patrón de expresión se suponía común a diferentes enfermedades. Entre ellos, miR-144 resultaba infraexpresado en muchos de los procesos patológicos incluidos en el estudio, configurándose por lo tanto como un marcador genérico de enfermedad. Este resultado coincidiría con nuestro estudio, aunque no hemos encontrado dicho descenso en pacientes con *C. albicans* y tampoco una correlación consistente entre este miARN y marcadores inflamatorios. Por tanto, lo único que podemos afirmar es que la infraexpresión de miR-144 en los pacientes con candidemia por *C. no albicans* sugiere un patrón de interacción

con el sistema inmunitario del huésped distinto respecto a las cepas de *C. albicans*, que podría en parte motivar las diferencias en términos de activación inflamatoria y pronóstico.

En síntesis, el perfil de expresión de los miARN descritos podría reflejar, en parte, la interacción huésped-hongo desde un punto de vista molecular. Es decir, la proliferación de *Candida* y la interacción con el sistema inmunitario, serían los desencadenantes de modificaciones moleculares finas que culminan con la adaptación de la respuesta inmunitaria a este patógeno y que pasan por la alteración en la expresión de los miARN como reguladores clave de múltiples procesos biológicos.

Un valor añadido que emerge de los resultados de este trabajo es la especificidad de la expresión de los miARN en función de la especie de *Candida*. De hecho disponemos de dos miARN sobreexpresados en candidemia por *C. albicans* y de uno infraexpresado en candidemia por *C. no albicans*. Este distinto perfil de expresión de los miARN de acuerdo a la etiología de la candidemia concuerda plenamente con la variabilidad en la activación inflamatoria y en las manifestaciones clínicas entre ambos subgrupos de pacientes. En otro ámbito dentro de las enfermedades infecciosas, un trabajo publicado en 2014 (117) mide y compara la expresión de miARN en modelos *in vitro* de mastitis: células de epitelio mamario bovino fueron expuestas a *E. coli* o *S. aureus*, inactivados por el calor. Los dos microorganismos activaban un perfil distinto de expresión de miARN, tanto respecto al tiempo de aparición, como respecto a las moléculas expresadas.

Los autores han interpretado este diferente perfil de miARN, como responsable del distinto comportamiento clínico de las dos bacterias en los casos de mastitis *in vivo*. De la misma forma, la expresión diferencial de los miARN observada en nuestro estudio entre candidemia por *C. albicans* y especies de *C. no albicans*, podría implicar la activación de un distinto patrón de respuesta inmunitaria, así como un distinto cuadro clínico.

2. Relación con los marcadores inflamatorios

Para valorar la posible asociación entre la expresión diferencial de miARN específicos con el nivel de los marcadores inflamatorios, hemos empleado los leucocitos y la PCR. Este análisis nos permite, por un lado, obtener más datos para determinar si la sobre- o infraexpresión de un determinado miARN es característica de la candidemia o si refleja de forma inespecífica la presencia de un estado inflamatorio; por otro lado, la correlación entre miARN y el estado inflamatorio en los pacientes con candidemia podría ayudarnos en la interpretación de su papel en la fisiopatología de este proceso infeccioso.

Los principales resultados son que la expresión de miR-99b y miR-125a se correlaciona negativamente con el recuento leucocitario, mientras que la expresión de miR-99b, miR-125a y miR-144 presenta una correlación positiva con la concentración de PCR en los pacientes con candidemia.

Sin embargo, estos resultados no son consistentes entre los diferentes grupos analizados, lo que obliga a realizar una interpretación de los mismos en

la que se tenga en cuenta las características de las cohortes de casos y controles, así como de los otros subgrupos que se han comparado. Como hemos visto, los pacientes con candidemia presentaban globalmente un mayor recuento leucocitario y una PCR más elevada respecto a los controles, aunque de forma no significativa. Esta diferencia es en gran parte acorde con los criterios de inclusión en el estudio, ya que los controles no podían presentar datos clínicos ni microbiológicos de infección sistémica. La PCR difería significativamente entre las candidemia por *C. albicans* y especies de *C. no albicans*. La menor concentración de PCR en el grupo de *C. no albicans*, espejo de una menor activación inflamatoria, se justifica probablemente por el hecho de que la mayoría de los casos en este subgrupo fueron causados por *C. parapsilosis*, que como se sabe se caracteriza por una menor agresividad clínica y un mejor pronóstico (144).

Dadas esas diferencias basales entre las distintas cohortes, hemos analizado la correlación de los marcadores inflamatorios en el grupo global que incluye todos los pacientes del estudio. El objetivo principal era descartar que la expresión diferencial de los miARN no fuese únicamente un marcador de la presencia de un proceso inflamatorio, traducido por un mayor recuento leucocitario y/o una PCR más elevada. Los resultados encontrados en el análisis de correlación de los miARN evaluados descartan esta posibilidad: no existe correlación entre los valores de la PCR y la expresión de ninguno de los miARN cuando se analizan globalmente todos los pacientes del estudio. Tampoco hemos encontrado un patrón claro de asociación o una correlación fuerte entre la expresión de los miARN y el recuento leucocitario. Podemos afirmar, por tanto, que el distinto perfil de expresión de los miARN analizados

no depende de las diferencias en el estado inflamatorio entre los grupos comparados.

Por otro lado, resulta difícil extraer conclusiones de los resultados de la correlación entre los niveles de miARN y los valores de PCR o leucocitos en los distintos subgrupos, debido a las condiciones metodológicas de nuestro estudio y al bajo tamaño muestral. En primer lugar, encontramos de forma constante una correlación negativa (coeficiente $r < 0$) entre el recuento leucocitario y la expresión de miR-99b y miR-125a, pero sin que sea significativa excepto para miR-99b en casos con candidemia. Si consideramos las evidencias procedentes de otras enfermedades infecciosas, esto podría tener una base fisiopatológica. Se ha mencionado anteriormente que existen datos de que estos dos miARN intervienen en la interacción hospedador-patógeno, desplazando el equilibrio a favor de este último. La sobreexpresión de ambos lleva en distintos modelos a la regulación negativa de la respuesta inmunitaria innata: permiten la penetración de las barreras epiteliales, inhiben la actividad de las células efectoras circulantes y favorecen la persistencia de la infección. Análogamente, en el caso de la candidemia, se podría suponer que miR-99b y miR-125a podrían reducir la capacidad de reacción inmunitaria del hospedador hacia el hongo. Estos miARN podrían contribuir en primera instancia a mantener una relación de comensalismo, para convertirse posteriormente, con el aumento de su expresión, en un peligroso aliado de la virulencia fúngica, llevando finalmente a la instauración de una infección invasiva. La correlación negativa entre su expresión y el recuento leucocitario se podría interpretar en esta perspectiva.

Respecto al otro marcador inflamatorio evaluado, en el subgrupo de pacientes con candidemia nuestros resultados muestran que la expresión de miR-99b, miR-125a y miR-144, se correlaciona positivamente con la concentración de la PCR. Este resultado, junto con la ausencia de correlación observada en el grupo global, podría sugerir que el nivel de expresión de estos miARN fuera también un marcador del estado inflamatorio provocado por la infección invasiva por *Candida*. Sin embargo, los resultados de este análisis están ciertamente limitados por la mezcla de casos por *C. albicans* y *C. no albicans*, ya que estos últimos presentaban valores de PCR significativamente más bajos. Sería interesante comprobar si esa relación se confirma para miR-99b y miR-125a en pacientes con candidemia por *C. albicans* en estudios con un tamaño muestral más amplio. En ese caso, podríamos decir que la candidemia por *C. albicans* se asocia a sobreexpresión de miR-99b y miR-125a, que a su vez se correlaciona positivamente con el valor de la PCR y negativamente con el recuento leucocitario. Estos datos aparentemente discordantes se podrían explicar de acuerdo a las evidencias fisiopatológicas mencionadas arriba: la activación inflamatoria desencadenada por *C. albicans* llevaría a la sobreexpresión de miR-99b y miR-125a (a mayor grado de inflamación mayor expresión) que a su vez podría ejercer un efecto inmunomodulador negativo con disminución del recuento leucocitario. En todo caso, tenemos que reconocer que esta hipótesis es meramente exploratoria dadas las limitaciones del trabajo, particularmente en cuanto a tamaño muestral de los subgrupos.

Dado que es el primer trabajo que evalúa la expresión de los miARN en pacientes con candidemia, no hay estudios previos que evalúen la relación con

los marcadores inflamatorios en este contexto y que pudieran ayudarnos para interpretar de otra forma nuestros resultados. En un trabajo publicado en 2016 por Caserta *et al.* (145), con un diseño y una metodología similar a nuestro estudio, se compara el perfil de expresión de miARN circulantes en pacientes con sepsis, SIRS de etiología no infecciosa y controles. Los miARN identificados como diferencialmente expresados se correlacionaron también con la concentración de citoquinas y marcadores inflamatorios, incluyendo la PCR. En los pacientes con sepsis (en el estudio no se especifica la etiología) se evidencia una correlación inversa entre la expresión de los miARN detectados y los marcadores inflamatorios. Los autores postulan a partir de estos datos que los miARN diferencialmente expresados actúan como reguladores de la respuesta inflamatoria e inmunitaria. En todo caso, sí es evidente que la relación entre expresión de los miARN, concentración de marcadores inflamatorios y comportamiento de los principales efectores inmunitarios podría ser un aspecto clave para comprender adecuadamente las bases fisiopatológicas de la candidemia y otras infecciones invasivas.

3. Relación con la evolución clínica

En nuestro estudio hemos encontrado que la expresión de miR-99b, miR-125a y miR-144 resulta más alta entre los pacientes con peor pronóstico pero de forma no significativa, punto en el que probablemente haya jugado un papel clave la limitación del bajo tamaño muestral. En todo caso, el perfil de expresión de los miARN ha demostrado ser útil como marcador pronóstico en distintos contextos clínicos (146-148). La sobre- o la infraexpresión de determinados miARN ha sido puesta en relación con la respuesta al tratamiento antitumoral o como predictor de progresión de la fibrosis hepática (118,149). En el contexto de las enfermedades infecciosas, existen diversos trabajos que evalúan la asociación de los miARN con la gravedad de la sepsis y con la mortalidad. Por ejemplo, en el estudio de Vasilescu *et al.* (85) se compara el perfil de expresión de los miARN entre una pequeña cohorte de controles sanos y de pacientes con sepsis. Pese al bajo tamaño muestral, el estudio demostró que la reducida expresión de miR-150 en los pacientes sépticos correlacionó bien con la gravedad del proceso, medida con la escala SOFA. En otras investigaciones, se han empleado otros scores clínicos, como el APACHE II (150), y también se ha comparado la expresión de los miARN en relación con la mortalidad en pacientes con sepsis (88). Ambas estrategias permitirían identificar adecuadamente el papel de los miARN como marcadores pronósticos. En ninguno de los trabajos mencionados se hace referencia a sepsis por *Candida* u otros patógenos fúngicos. No disponemos por lo tanto de referencias respecto al comportamiento de los miARN en este contexto como marcadores pronósticos.

Nuestro trabajo, al no encontrar resultados significativos, no nos permite identificar ningún miARN con valor pronóstico en nuestra muestra. Sin embargo, la significación de estos resultados está limitada por el reducido tamaño muestral, así como por la exigüidad de las cohortes obtenidas en base a la subclasificación por especie fúngica. Otra limitación relevante es el escaso número de fallecidos en la cohorte de los casos. También hay que reseñar que los resultados de nuestro estudio podrían estar sesgados por la mayor gravedad clínica registrada en los casos de candidemia por *C. albicans*: de hecho, los 3 fallecimientos ocurrieron todos en esta subcohorte, mientras que el grupo de otras especies de *Candida* está constituido principalmente por *C. parapsilosis*, que como es conocido se caracteriza por un mejor pronóstico. Para tener una mejor orientación sobre el poder pronóstico de estos miARN sería por lo tanto necesario llevar a cabo un análisis en una cohorte más numerosa de casos producidos únicamente por *C. albicans*, en el caso de miR-99b y miR-125a, y únicamente por especies de *C. no albicans*, en el caso de miR-144. Finalmente, no podemos descartar que otros miARN, diferentes de aquellos con una expresión diferencial entre casos y controles, puedan tener también un valor pronóstico en candidemia, pero el diseño de nuestro estudio no nos permite detectarlo.

4. Consideraciones metodológicas y potenciales limitaciones

El análisis del perfil de expresión de los miARN en las cohortes de casos y controles se ha realizado inicialmente mediante una técnica de secuenciación masiva y los resultados obtenidos se han confirmado posteriormente mediante RT-qPCR, con lo que la concordancia entre las dos técnicas experimentales confiere mayor fiabilidad a los resultados encontrados. La NGS es un procedimiento de introducción relativamente reciente (151), que se va imponiendo respecto a la tecnología del *microarray* en el análisis de los miARN, por su mayor potencia y sensibilidad. Una de sus ventajas es que permite determinar todos los miARN presentes en una determinada muestra (143, 151). Además no tiene un límite superior de detección en la cuantificación de las secuencias de ácidos nucleicos y, por lo tanto, permite detectar un rango más amplio de niveles de expresión génica. La fiabilidad de los resultados de la NGS ha sido previamente validada, empleando la RT-qPCR (152) y *spike-in* ARN de concentración conocida (153). Los experimentos de NGS son además altamente reproducibles y requieren generalmente cantidades inferiores de ARN (151). En nuestro estudio, hemos encontrado un número relativamente bajo de miARN con un cambio significativo en sus niveles en los casos respecto a los controles, si comparamos con otros estudios similares que emplean la NGS como técnica de detección (145, 154). Esto puede ser en parte debido a la meticulosa estrategia de selección de los controles, que presentaban características basales superponibles a los casos, en lo que se refiere a edad, sexo, comorbilidades y otros factores de riesgo. Tras la aplicación del FDR, solo 3 miARN se encontraban diferencialmente expresados de manera significativa. Para ampliar el número de moléculas candidatas, se

ha fijado el umbral de la P en 0,2. Esta estrategia, que ha llevado a 7 el número de miARN cuyos niveles se consideran alterados en casos respecto a controles, aumenta lógicamente el riesgo de falsos positivos. De todas formas, la posibilidad de medir singularmente la expresión de cada uno de estos miARN mediante RT-qPCR minimiza este riesgo. Hay que resaltar que las dos técnicas experimentales empleadas han mostrado una convergencia adecuada en los resultados: 2 de los 3 miARN identificados como significativamente alterados con la NGS tras el ajuste mediante FDR y uno de los otros 4 del listado ampliado con P ajustada $< 0,20$ y $P < 0,05$, han mostrado diferencias significativas en la qPCR de signo concordante. De los restantes 4 miARN, para dos de ellos los resultados de la qPCR iban en la misma dirección de la NGS, pero sin alcanzar significación estadística. En tan solo dos casos los resultados eran de signo opuesto en la qPCR y en la NGS, tratándose ambos de miARN con resultados de la qPCR no significativa y del listado ampliado de la NGS (con P ajustada no significativa). Por tanto, creemos que los resultados significativos encontrados con concordancia entre la qPCR y la NGS presentan un bajo riesgo de error tipo α (falso positivo). Esta presunción se refuerza por el hecho de que otros estudios ya han encontrado alteraciones en la expresión de algunos de estos miARN.

Otra consideración metodológica de relevancia atañe al análisis por *pool* que se ha realizado en el procedimiento de secuenciación masiva. Recordemos que, por cada subgrupo comparado, se han obtenido muestras agrupando el ARN procedente de distintos pacientes con la misma condición (CA, CNA o controles). Este es un aspecto controvertido en este tipo de experimentos, existiendo ventajas e inconvenientes del análisis de las

muestras agrupadas en *pool*. Algunos trabajos señalan el riesgo de un sesgo de agrupamiento (*pooling*), es decir que la agrupación de las muestras pueda llevar a resultados que no reflejan adecuadamente la población en estudio. Esto se traduciría en un aumento de los falsos positivos y en una disminución del valor predictivo positivo de los genes identificados como diferencialmente expresados (155-157). Sin embargo, según otros autores (158), el análisis en *pool* permite reducir la variabilidad biológica interindividual manteniendo la precisión y el poder estadístico del análisis. Por otro lado, al reducir el número de muestras analizadas, se reducen también significativamente los costes (158). En nuestro trabajo, nos hemos decantado por el análisis en *pool* por esta mayor coste-efectividad.

El control o gen de referencia empleado para la normalización es otro aspecto fundamental de la fase experimental de RT-qPCR (159). Así, la cuantificación relativa de cada miARN requiere la normalización respecto a un gen de referencia, cuyo nivel de expresión sea constante, para calibrar la variabilidad técnica. En nuestro trabajo, hemos empleado un gen de referencia endógeno, el miR-103, basándonos en lo descrito en la literatura y comprobándolo en nuestras propias muestras (108). La correcta selección del gen de referencia es un aspecto muy controvertido en el mundo de la biología molecular y de la bioinformática, ya que puede comprometer la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos. Conceptualmente el gen de referencia debería mantener una expresión estable en las distintas muestras que se quieren analizar. Por eso, clásicamente se han empleado en distintos trabajos de investigación (160) genes considerados como constitutivos, denominados *housekeeping*, pero en muchos casos sin ningún tipo de

comprobación en las condiciones experimentales concretas de cada trabajo. Esta metodología presenta el problema de que se ha demostrado que muchos de los genes previamente clasificados en esta categoría de genes de referencia o *housekeeping* presentan niveles variables de expresión en distintos tejidos y en diversas condiciones experimentales. Es decir, un gen puede no modificar su expresión en un determinado tipo celular y, por tanto, ser útil como gen de referencia bajo ciertas condiciones pero sufrir una modificación de sus niveles en un modelo de respuesta inflamatoria. Por lo tanto, coincidimos plenamente con los autores que indican que es preciso confirmar siempre la validez de los genes de referencia entre las muestras objeto de análisis en el experimento concreto que se está realizando (159). Existen varias herramientas informáticas que permiten valorar la bondad de los genes para este uso. En nuestro trabajo, los genes seleccionados tras una revisión bibliográfica inicial han sido validados con tres de las técnicas estadísticas más frecuentemente empleadas en este campo (105-107) y los diferentes métodos empleados concordaban en considerar a miR-103 como gen de referencia, dado que su expresión fue la más estable en nuestras muestras. El hecho de haber obtenido el mismo resultado mediante tres técnicas diferentes confiere validez al proceso de normalización de los datos y mayor calidad en la cuantificación relativa de los miARN en estudio.

Además de las consideraciones indicadas, es obligado evidenciar algunas limitaciones de este trabajo. En primer lugar, el número de muestras analizadas es pequeño. Esto reduce sin duda la potencia estadística de nuestro estudio, especialmente en la evaluación de la relación de los miARN con los marcadores inflamatorios o pronósticos dentro del grupo de pacientes

con candidemia. Sería interesante, por tanto, ampliar el tamaño muestral para estudiar más en detalle el comportamiento de los miARN detectados tanto en el subgrupo de pacientes con candidemia por *C. albicans*, como en aquellos con candidemia por otras especies de *Candida*.

En segundo lugar, como se ha evidenciado anteriormente, entre los 20 casos de candidemia incluidos en el estudio, se registraron solo 3 desenlaces fatales, frente a una mortalidad cruda a 30 días superior al 30% en nuestro registro epidemiológico global. Esta discordancia es probablemente consecuencia de un sesgo de selección: la necesidad de la obtención de un consentimiento informado para la inclusión en el estudio y la exclusión de los pacientes que ya hubieran recibido tratamiento antifúngico durante al menos 48 horas ha llevado probablemente a la no selección de los pacientes en condiciones más críticas. Además, si por un lado, hemos resaltado el buen emparejamiento de casos y controles, respecto a las características basales, por otro, el grupo de control, de acuerdo al diseño del estudio, está constituido por pacientes sin datos ni sospecha clínico-microbiológica de un proceso infeccioso intercurrente. Aunque este diseño presenta indudables ventajas, no podemos afirmar con seguridad que las diferencias encontradas sean específicas de la candidemia y que no puedan encontrarse también en bacteriemia de otra etiología u otros procesos infecciosos sistémicos. Los datos de la literatura, de todas formas, apoyan la posibilidad que el perfil de expresión de miARN encontrado sea característico de la candidemia. De hecho, en ninguno de los estudios publicados hasta el momento sobre miARN y sepsis, se ha descrito la deregulación de miR-99b, miR-125a o miR-144. No obstante, para esclarecer este aspecto, podría ser útil repetir estos

experimentos comparando también con una cohorte de pacientes con bacteriemia de otra etiología. Por otro lado, el hecho de haber seleccionado un subgrupo de pacientes sin tratamiento antifúngico previo nos ofrece la posibilidad de obtener un perfil de expresión de miARN debido a la candidemia y no modificado por el tratamiento recibido, pero a la vez corremos el riesgo de que nuestra muestra refleje la situación de un grupo de pacientes con menor respuesta sistémica a la candidemia o con menor gravedad de la enfermedad.

En nuestro estudio no disponemos tampoco del análisis de las alteraciones en la expresión proteica potencialmente relacionadas con la expresión diferencial de miR-99b, miR-125a y miR-144. Todo ello se ha planteado para una fase posterior de esta investigación por lo que, de momento, podemos formular solo hipótesis fisiopatológicas sobre el papel de estos miARN.

5. Aplicaciones clínicas

En nuestro estudio hemos identificado por primera vez un perfil diferencial de expresión de miARN en pacientes con *C. albicans* y especies de *C. no albicans*, comprobado mediante qPCR. La identificación de este perfil característico de la candidemia podría tener un impacto importante sobre distintos aspectos concernientes a esta infección nosocomial.

La primera y más obvia área de aplicación podría ser el diagnóstico. Actualmente el estándar de oro para el diagnóstico de la candidemia es la realización de hemocultivos. Sin embargo, como se ha resaltado previamente,

esta técnica microbiológica presenta varias limitaciones, como una sensibilidad limitada y unos tiempos relativamente prolongados para la obtención de los resultados. La identificación de miARN específicos de la candidemia brindada por este trabajo, una vez que se confirmaran en una cohorte de validación independiente, puede contribuir de forma importante en este campo.

La utilidad de los miARN como marcadores diagnósticos ha sido explorada ya previamente en otros ámbitos. Lawrie *et al.* (161) fueron los primeros en proponer los miARN como potenciales marcadores de enfermedad cuando compararon los niveles séricos de miARN en pacientes con linfoma de células B e individuos sanos. Desde entonces se ha descrito la presencia de miARN en un amplio número de fluidos corporales además del torrente sanguíneo, lo que facilita su obtención. Además, algunas propiedades físico-químicas subrayan su potencial papel como biomarcadores clínicos: se pueden obtener mediante técnicas mínimamente invasivas en tipos de muestras utilizadas actualmente en los laboratorios clínicos; son altamente estables y presentan una vida media larga dentro de la muestra; debido a su pequeño tamaño y a su composición química, los miARN son moléculas menos complejas que la mayoría de las moléculas biológicas del plasma actualmente empleadas como biomarcadores. Un test sanguíneo basado en miARN podría por lo tanto ser una potente herramienta no invasiva que proporcionase al clínico una valiosa información para el correcto manejo del paciente (162).

Sin embargo, la aportación concreta de los miARN en términos de sensibilidad y capacidad de diagnóstico rápido está por definir. Aunque dispusiéramos de una firma molecular validada de la candidemia, habría que

establecer puntos de corte que garanticen su validez y confiabilidad, así como establecer el tiempo óptimo de recogida y procesado de la muestra, la disponibilidad y la estandarización de las técnicas experimentales y los costes. También sería necesario definir un algoritmo para identificar a los pacientes que se beneficien de estas pruebas moleculares así como valorar la integración con técnicas diagnósticas ya existentes para obtener la máxima rentabilidad. De forma general, aunque la estabilidad de los miARN en sangre los hace unos candidatos atractivos como biomarcadores, su uso en la clínica todavía no se ha producido dada la inespecificidad de los mismos y la falta de estandarización de las técnicas empleadas para su análisis.

Existe también otro tipo de consideración, menos mencionada en el ámbito de las infecciones nosocomiales, pero en nuestra opinión igualmente relevante. Según los actuales criterios (61), un único hemocultivo positivo por especies de *Candida* sería suficiente para establecer el diagnóstico clínico de candidemia. Esto encuentra su justificación en la virulencia de estos hongos, en su capacidad de formación y adhesión a biopelículas, y en su impacto en términos de morbimortalidad. De esta forma, también algunos casos de aislamientos microbiológicos, clínicamente no relevantes, como por contaminación de la muestra o por colonización de dispositivos intravasculares, adquieren la etiqueta de infección fúngica invasiva y reciben manejo correspondiente. Esto implica que algunos pacientes podrían recibir, de forma innecesaria, el tratamiento antifúngico prolongado que recomiendan las guías clínicas más recientes (al menos 14 días desde la negativización de los hemocultivos) (61, 62). Para los pacientes con aislamientos resistentes a azoles, esto puede significar también una prolongación concordante de la

estancia hospitalaria. Todo esto tiene un efecto considerable sobre el gasto sanitario (a través del coste de los antifúngicos y de la estancia hospitalaria), pero también sobre la salud de los pacientes (efectos colaterales de los antifúngicos, riesgo de infecciones nosocomiales) y desde un punto de vista ecológico (selección de cepas resistentes a los antifúngicos empleados).

En este contexto, los miARN en calidad de expresión molecular de una interacción del patógeno con el sistema inmunitario del hospedador, serían el resultado de un proceso infeccioso clínicamente relevante y podrían contribuir, por lo tanto, a interpretar correctamente los cultivos microbiológicos. En otras palabras, tendría una enorme utilidad poder disponer de un determinado patrón de miARN que nos sugiera una infección invasiva por *Candida*. Así, en caso de positividad de hemocultivo con contexto clínico no concordante o por lo menos dudoso, el perfil de expresión de los miARN podría ayudar a discriminar entre un hallazgo sin relevancia clínica y una candidemia verdadera. Un estudio con una muestra más numerosa nos permitiría evaluar la sensibilidad y especificidad de esta prueba para este propósito.

Como se ha descrito previamente, el perfil de expresión de los miARN identificado varía según la especie de *Candida* responsable. Este elemento podría representar otro valor añadido en las aplicaciones diagnósticas de estos marcadores. De hecho, la medición de los miARN, además de proporcionar el diagnóstico de candidemia, podría ofrecer una primera orientación sobre la especie de *Candida* involucrada. Al grupo de especies de *Candida* no *albicans*, cuya prevalencia está globalmente en aumento, pertenecen cepas con sensibilidad disminuida a fluconazol, como *C. glabrata* y *C. krusei*.. Por lo tanto,

disponer de una firma molecular específica de cada especie fúngica, en forma de perfil de expresión de los miARN descritos, antes de que esté disponible la identificación microbiológica y el estudio de sensibilidad, podría permitir diferenciar entre ellas.

En cuanto a las implicaciones terapéuticas, la primera deriva de la posibilidad de conocer con antelación tanto la presencia de candidemia como la especie implicada. Ello permitiría dirigir el tratamiento antifúngico y aumentar la tasa de acierto terapéutico en las fases precoces de la infección. En segundo lugar, en caso de que se confirmara la implicación fisiopatológica de los miARN identificados con expresión diferencial entre casos y controles, ello podría permitir plantear nuevas estrategias terapéuticas con los miARN como dianas. Aunque no supone el tratamiento de elección ahora mismo, ya se ha desarrollado un inhibidor del miR-122 (miravirsén), eficaz en la supresión del ARN viral del virus de la hepatitis C (79).

Respecto a la utilidad pronóstica de los miARN, los datos de los que disponemos no son concluyentes. En primer lugar, el diseño de nuestro estudio no es el óptimo para encontrar marcadores pronósticos y sería preciso un aumento del tamaño muestral. En segundo lugar, hemos centrado nuestro análisis en los miARN expresados diferencialmente en pacientes con candidemia pero, en función de su papel fisiopatológico, pueden ser otros miARN los que tengan valor como marcadores pronósticos en la candidemia.

En conclusión, nuestro trabajo supone el primer estudio realizado en el ámbito del miARN y pacientes con candidemia y nos ha permitido identificar un perfil de expresión. La confirmación de estos resultados en cohortes independientes y el perfeccionamiento y la estandarización de las técnicas de procesamiento y medición de los miARN, podrían convertir estas moléculas en útiles marcadores diagnósticos. Por otro lado, el estudio de un número mayor de pacientes permitiría aclarar su impacto pronóstico. En último, el estudio del papel de estas moléculas en la fisiopatología de la candidemia podría contribuir a entender mejor los mecanismos que permiten a este hongo, habitualmente inocuo, provocar infecciones invasivas potencialmente mortales.

VI. CONCLUSIONES

1. El análisis mediante técnicas de secuenciación masiva permite identificar 7 miARN diferencialmente expresados en pacientes con candidemia: miR-99b, miR-125a, miR-144, miR-5690, miR-584, let-7a, miR-223.
2. La expresión de miR-99b y miR-125a está incrementada en pacientes con candidemia por *C. albicans* en comparación con pacientes con candidemia por otras especies de *Candida* y con controles sin infección.
3. La expresión de miR-144 está reducida en pacientes con candidemia por especies de *Candida* diferentes de *C. albicans* en comparación con pacientes con candidemia por *C. albicans* y con controles sin infección.
4. No se ha encontrado que los miARN diferencialmente expresados en pacientes con candidemia se correlacionen con la presencia de inflamación sistémica ni que presenten valor pronóstico.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Brandt ME, Warnock DW. Taxonomy and Classification of Fungi. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, *et al.*, editors. Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 1935-43.
2. Bennett JE. Introduction to Mycoses. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. p. 2874-8.
3. Gomez J, Garcia-Vazquez E, Hernandez A, Espinosa C, Ruiz J. [Nosocomial candidemia: new challenges of an emergent problem]. Rev Esp Quimioter. 2010;23:158-68.
4. Edwards JE. *Candida* species. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. p. 2879-94.
5. Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33:673-88.
6. Martins N, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Henriques M. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. Mycopathologia. 2014;177:223-40.
7. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. N Engl J Med. 2015;373:1445-56.
8. Azie N, Neofytos D, Pfaller M, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance(R) registry and invasive fungal infections: update 2012. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73:293-300.
9. Howell SA, Hazen KC, Brandt ME. *Candida*, *Cryptococcus*, and Other Yeasts of Medical Importance. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, *et al.* Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition. Washington, DC: ASM Press; 2015. p. 1984-2014.

10. Cervera C. [Candidemia and invasive candidiasis in the adult: clinical forms and treatment]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:483-91.
11. Khalid A, Clough LA, Symons RC, Mahnken JD, Dong L, Eid AJ. Incidence and clinical predictors of ocular candidiasis in patients with *Candida* fungemia. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2014;2014:650235.
12. Kauffman CA. *Candida* endocarditis and suppurative thrombophlebitis. [Internet]. Waltham (MA): UpToDate; [acceso 16 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://www.uptodate.com/>.
13. Cox GM, Kauffman CA. *Candida* infections of the bladder and kidneys. [Internet]. Waltham (MA): UpToDate; [acceso 16 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://www.uptodate.com/>.
14. Kauffman CA. *Candida* osteoarticular infections. [Internet]. Waltham (MA): UpToDate; [acceso 16 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://www.uptodate.com/>.
15. Legrand F, Lecuit M, Dupont B, Bellaton E, Huerre M, Rohrlach PS, *et al*. Adjuvant corticosteroid therapy for chronic disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2008;46:696-702.
16. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, *et al*. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:317-22.
17. Peman J, Zaragoza R, Salavert M. [Prevention and control of nosocomial and health-care facilities associated infections caused by species of *Candida* and other yeasts]. *Rev Esp Quimioter*. 2013;26:298-311.
18. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, *et al*. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5848-59.

19. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73:45-8.
20. Fortun J, Martin-Davila P, Gomez-Garcia de la Pedrosa E, Pintado V, Cobo J, Fresco G, *et al.* Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. *J Infect.* 2012;65:64-70.
21. Jung DS, Farmakiotis D, Jiang Y, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP. Uncommon *Candida* Species Fungemia among Cancer Patients, Houston, Texas, USA. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:1942-50.
22. Canton E, Peman J, Quindos G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Alvarez M, *et al.* Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:5590-6.
23. Peman J, Canton E, Quindos G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, *et al.* Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1181-7.
24. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol.* 2009;53:41-4.
25. European Centre for Disease Prevention and Control. *Candida auris* in healthcare settings – Europe – 19 December 2016. Stockholm: ECDC; 2016.
26. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, *et al.* Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin Infect Dis.* 2017;64:134-40.

27. Valerio M, Munoz P, Rodriguez CG, Caliz B, Padilla B, Fernandez-Cruz A, *et al.* Antifungal stewardship in a tertiary-care institution: a bedside intervention. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:492 e1-9.
28. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20 Suppl 6:5-10.
29. Dimopoulos G, Karabinis A, Samonis G, Falagas ME. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26:377-84.
30. McCarty TP, Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30:103-24.
31. Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Alvarez-Lerma F, *et al.* A bedside scoring system ("*Candida* score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med.* 2006;34:730-7.
32. Ostrosky-Zeichner L, Sable C, Sobel J, Alexander BD, Donowitz G, Kan V, *et al.* Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26:271-6.
33. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* 1994;220:751-8.
34. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, *et al.* Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis.* 2001;33:177-86.
35. Bassetti M, Righi E, Ansaldi F, Merelli M, Trucchi C, De Pascale G, *et al.* A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med.* 2014;40:839-45.

36. Hu B, Du Z, Kang Y, Zang B, Cui W, Qin B, *et al.* Catheter-related *Candida* bloodstream infection in intensive care unit patients: a subgroup analysis of the China-SCAN study. *BMC Infect Dis.* 2014;14:594.
37. Wang H, Liu N, Yin M, Han H, Yue J, Zhang F, *et al.* The epidemiology, antifungal use and risk factors of death in elderly patients with candidemia: a multicentre retrospective study. *BMC Infect Dis.* 2014;14:609.
38. Chow JK, Golan Y, Ruthazer R, Karchmer AW, Carmeli Y, Lichtenberg DA, *et al.* Risk factors for *albicans* and non-*albicans* candidemia in the intensive care unit. *Crit Care Med.* 2008;36:1993-8.
39. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:133-63.
40. Playford EG, Marriott D, Nguyen Q, Chen S, Ellis D, Slavin M, *et al.* Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: risk factors for non-*albicans Candida* spp. *Crit Care Med.* 2008;36:2034-9.
41. Luzzati R, Cavinato S, Giangreco M, Grana G, Centonze S, Deiana ML, *et al.* Peripheral and total parenteral nutrition as the strongest risk factors for nosocomial candidemia in elderly patients: a matched case-control study. *Mycoses.* 2013;56:664-71.
42. Jorda-Marcos R, Alvarez-Lerma F, Jurado M, Palomar M, Nolla-Salas J, Leon MA, *et al.* Risk factors for candidaemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. *Mycoses.* 2007;50:302-10.
43. Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, *et al.* Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med.* 2009;37:1612-8.
44. Hachem R, Hanna H, Kontoyiannis D, Jiang Y, Raad I. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer.* 2008;112:2493-9.

45. Han SS, Yim JJ, Yoo CG, Kim YW, Han SK, Shim YS, *et al.* Clinical characteristics and risk factors for nosocomial candidemia in medical intensive care units: experience in a single hospital in Korea for 6.6 years. *J Korean Med Sci.* 2010;25:671-6.
46. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:772-85.
47. Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, *et al.* Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1829-35.
48. Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med.* 2011;39:665-70.
49. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, *et al.* International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2009;302:2323-9.
50. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004;39:309-17.
51. Quindós G. Epidemiología actual de la enfermedad fúngica invasora. In: Rivas P, Pemán J, Córdoba S, Melhem M, editors. *Aproximación clínico-diagnóstica de la enfermedad fúngica invasora: Fundación Micellium*; 2017.
52. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med.* 1988;148:2642-5.

53. Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis*. 2005;41:1232-9.
54. Bailly S, Garnaud C, Cornet M, Pavese P, Hamidfar-Roy R, Foroni L, *et al*. Impact of systemic antifungal therapy on the detection of *Candida* species in blood cultures in clinical cases of candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35:1023-32.
55. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, *et al*. Multicenter clinical evaluation of the (1-->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis*. 2005;41:654-9.
56. Ayats J, Martin-Mazuelos E, Peman J, Quindos G, Sanchez F, Garcia-Rodriguez J, *et al*. [Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) guidelines for the diagnosis of invasive fungal infections. 2010 update]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:39 e1-15.
57. Phoompoung P, Chayakulkeeree M. Recent Progress in the Diagnosis of Pathogenic *Candida* Species in Blood Culture. *Mycopathologia*. 2016;181:363-9.
58. Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2011;49:665-70.
59. Eschenauer GA, Nguyen MH, Clancy CJ. Is Fluconazole or an Echinocandin the Agent of Choice for Candidemia. *Ann Pharmacother*. 2015;49:1068-74.
60. Rex JH, Bennett JE, Sugar AM, Pappas PG, van der Horst CM, Edwards JE, *et al*. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. *N Engl J Med*. 1994;331:1325-30.

61. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62:e1-50.
62. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, *et al.* ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18 Suppl 7:19-37.
63. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Cumbie R, Driscoll E, Pasculle AW, *et al.* Rate of FKS Mutations among Consecutive *Candida* Isolates Causing Bloodstream Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:7465-70.
64. Moriyama B, Gordon LA, McCarthy M, Henning SA, Walsh TJ, Penzak SR. Emerging drugs and vaccines for candidemia. *Mycoses.* 2014;57:718-33.
65. Sandison T, Ong V, Lee J, Thye D. Safety and Pharmacokinetics of CD101 IV, a Novel Echinocandin, in Healthy Adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61.
66. Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martinez JA, Lopez J, *et al.* *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect.* 2011;77:157-61.
67. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, *et al.* Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:O245-54.
68. Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fursted K, Johansen HK, Kjaeldgaard P, *et al.* National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J Clin Microbiol.* 2011;49:325-34.

69. Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, *et al.* 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. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1681-5.
70. Boon RA, Jae N, Holdt L, Dimmeler S. Long Noncoding RNAs: From Clinical Genetics to Therapeutic Targets? *J Am Coll Cardiol.* 2016;67:1214-26.
71. Ohno S. So much "junk" DNA in our genome. *Brookhaven Symp Biol.* 1972;23:366-70.
72. Rebane A, Akdis CA. MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:15-26.
73. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75:843-54.
74. mirbase.org [Internet]. miRBase: the microRNA database. Release 21; 2014 [acceso 27 de septiembre de 2014]. Disponible en: <http://www.mirbase.org>.
75. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15524-9.
76. van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res.* 2011;108:219-34.
77. Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol.* 2008;18:131-40.
78. Waldron PR, Holodniy M. MicroRNA and hepatitis C virus - challenges in investigation and translation: a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;80:1-12.

79. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, *et al.* Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med.* 2013;368:1685-94.
80. Singh Y, Kaul V, Mehra A, Chatterjee S, Tousif S, Dwivedi VP, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* controls microRNA-99b (miR-99b) expression in infected murine dendritic cells to modulate host immunity. *J Biol Chem.* 2013;288:5056-61.
81. Lin Y, Deng W, Pang J, Kemper T, Hu J, Yin J, *et al.* The microRNA-99 family modulates hepatitis B virus replication by promoting IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR/ULK1 signaling-induced autophagy. *Cell Microbiol.* 2017;19.
82. Essandoh K, Li Y, Huo J, Fan GC. MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock.* 2016;46:122-31.
83. Ivady B, Beres BJ, Szabo D. Recent advances in sepsis research: novel biomarkers and therapeutic targets. *Curr Med Chem.* 2011;18:3211-25.
84. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, *et al.* Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol.* 2007;179:5082-9.
85. Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, *et al.* MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One.* 2009;4:e7405.
86. Roderburg C, Luedde M, Vargas Cardenas D, Vucur M, Scholten D, Frey N, *et al.* Circulating microRNA-150 serum levels predict survival in patients with critical illness and sepsis. *PLoS One.* 2013;8:e54612.
87. Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, Wan XJ, *et al.* Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394:184-8.

88. Wang H, Zhang P, Chen W, Feng D, Jia Y, Xie L. Serum microRNA signatures identified by Solexa sequencing predict sepsis patients' mortality: a prospective observational study. *PLoS One*. 2012;7:e38885.
89. Li T, Morgan MJ, Choksi S, Zhang Y, Kim YS, Liu ZG. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nat Immunol*. 2010;11:799-805.
90. Monk CE, Hutvagner G, Arthur JS. Regulation of miRNA transcription in macrophages in response to *Candida albicans*. *PLoS One*. 2010;5:e13669.
91. Gaieski DF, Mikkelsen ME, Band RA, Pines JM, Massone R, Furia FF, *et al*. Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. *Crit Care Med*. 2010;38:1045-53.
92. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, *et al*. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med*. 2002;137:791-7.
93. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40:373-83.
94. Von Korff M, Wagner EH, Saunders K. A chronic disease score from automated pharmacy data. *J Clin Epidemiol*. 1992;45:197-203.
95. Rhee JY, Kwon KT, Ki HK, Shin SY, Jung DS, Chung DR, *et al*. Scoring systems for prediction of mortality in patients with intensive care unit-acquired sepsis: a comparison of the Pitt bacteremia score and the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II scoring systems. *Shock*. 2009;31:146-50.
96. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med*. 1977;296:1305-9.

97. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
98. García-López J. Biogénesis y expresión de microRNAs durante el desarrollo preimplantacional de ratón. [Tesis doctoral]. Madrid: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid; 2011.
99. Andrews S. A quality control application for high throughput sequence data. [Internet] 2010. [acceso 20 de junio de 2014]. Disponible en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/>.
100. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMB-net.Journal. 2012;17:10-12.
101. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics. 2011;12:323.
102. Torres-Triana JL. Expresión de PPAR- γ y miR-27 en el tejido adiposo de pacientes obesos. [Tesis doctoral]. Salamanca: Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca; 2015.
103. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. Biotechniques. 2000;29:332-7.
104. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. J Biochem Biophys Methods. 2000;46:69-81.
105. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, *et al*. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 2002;3:RESEARCH0034.

106. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64:5245-50.
107. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004;26:509-15.
108. Gharbi S, Shamsara M, Khateri S, Soroush MR, Ghorbanmehr N, Tavallaei M, *et al.* Identification of Reliable Reference Genes for Quantification of MicroRNAs in Serum Samples of Sulfur Mustard-Exposed Veterans. *Cell J.* 2015;17:494-501.
109. Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, *et al.* Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci.* 2012;57:897-904.
110. Shi FP, Wang XH, Zhang HX, Shang MM, Liu XX, Sun HM, *et al.* MiR-103 regulates the angiogenesis of ischemic stroke rats by targeting vascular endothelial growth factor (VEGF). *Iran J Basic Med Sci.* 2018;21:318-24.
111. Glickman ME, Rao SR, Schultz MR. False discovery rate control is a recommended alternative to Bonferroni-type adjustments in health studies. *J Clin Epidemiol.* 2014;67:850-7.
112. Grubbs FE. Sample criteria for testing outlying observations. *Annal Math Stat.* 1950;21:27-58.
113. Vaquero-Herrero MP, Ragozzino S, Castano-Romero F, Siller-Ruiz M, Sanchez Gonzalez R, Garcia-Sanchez JE, *et al.* The Pitt Bacteremia Score, Charlson Comorbidity Index and Chronic Disease Score are useful tools for the prediction of mortality in patients with *Candida* bloodstream infection. *Mycoses.* 2017;60:676-85.

114. Acunzo M, Croce CM. MicroRNA in Cancer and Cachexia - A Mini-Review. *J Infect Dis.* 2015;212 Suppl 1:S74-7.
115. Dai LL, Gao JX, Zou CG, Ma YC, Zhang KQ. mir-233 modulates the unfolded protein response in *C. elegans* during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1004606.
116. Davis MA, Lim JY, Soyer Y, Harbottle H, Chang YF, New D, *et al.* Development and validation of a resistance and virulence gene microarray targeting *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J Microbiol Methods.* 2010;82:36-41.
117. Jin W, Ibeagha-Awemu EM, Liang G, Beaudoin F, Zhao X, Guan le L. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC Genomics.* 2014;15:181.
118. Lukamowicz-Rajska M, Mittmann C, Prummer M, Zhong Q, Bedke J, Hennenlotter J, *et al.* MiR-99b-5p expression and response to tyrosine kinase inhibitor treatment in clear cell renal cell carcinoma patients. *Oncotarget.* 2016;7:78433-47.
119. Li W, Chang J, Wang S, Liu X, Peng J, Huang D, *et al.* miRNA-99b-5p suppresses liver metastasis of colorectal cancer by down-regulating mTOR. *Oncotarget.* 2015;6:24448-62.
120. microRNA.org [Internet]. Targets and Expression; 2017 [acceso 26 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.microrna.org/microrna/home.do>.
121. Target Scan [Internet]. 2017 [acceso 26 de octubre de 2017]. Disponible en: http://www.targetscan.org/vert_61/.
122. Donahue AC, Fruman DA. Distinct signaling mechanisms activate the target of rapamycin in response to different B-cell stimuli. *Eur J Immunol.* 2007;37:2923-36.

123. Nandagopal N, Ali AK, Komal AK, Lee SH. The Critical Role of IL-15-PI3K-mTOR Pathway in Natural Killer Cell Effector Functions. *Front Immunol.* 2014;5:187.
124. Volling K, Thywissen A, Brakhage AA, Saluz HP. Phagocytosis of melanized *Aspergillus* conidia by macrophages exerts cytoprotective effects by sustained PI3K/Akt signalling. *Cell Microbiol.* 2011;13:1130-48.
125. Moyes DL, Shen C, Murciano C, Runglall M, Richardson JP, Arno M, *et al.* Protection against epithelial damage during *Candida albicans* infection is mediated by PI3K/Akt and mammalian target of rapamycin signaling. *J Infect Dis.* 2014;209:1816-26.
126. Wang X, Hao L, Bu HF, Scott AW, Tian K, Liu F, *et al.* Spherical nucleic acid targeting microRNA-99b enhances intestinal MFG-E8 gene expression and restores enterocyte migration in lipopolysaccharide-induced septic mice. *Sci Rep.* 2016;6:31687.
127. Coppola N, de Stefano G, Panella M, Onorato L, Iodice V, Minichini C, *et al.* Lowered expression of microRNA-125a-5p in human hepatocellular carcinoma and up-regulation of its oncogenic targets sirtuin-7, matrix metalloproteinase-11, and c-Raf. *Oncotarget.* 2017;8:25289-99.
128. Zhong L, Sun S, Shi J, Cao F, Han X, Chen Z. MicroRNA-125a-5p plays a role as a tumor suppressor in lung carcinoma cells by directly targeting STAT3. *Tumour Biol.* 2017;39:1010428317697579.
129. Bi Q, Tang S, Xia L, Du R, Fan R, Gao L, *et al.* Ectopic expression of MiR-125a inhibits the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting MMP11 and VEGF. *PLoS One.* 2012;7:e40169.
130. Shang H, Wang T, Shang F, Huang KM, Li YQ. A germline mutation in the miR125a coding region reduces miR125a expression and is associated with human gastric cancer. *Mol Med Rep.* 2014;10:1839-44.

131. Cowden Dahl KD, Dahl R, Kruichak JN, Hudson LG. The epidermal growth factor receptor responsive miR-125a represses mesenchymal morphology in ovarian cancer cells. *Neoplasia*. 2009;11:1208-15.
132. Fan Z, Cui H, Xu X, Lin Z, Zhang X, Kang L, *et al*. MiR-125a suppresses tumor growth, invasion and metastasis in cervical cancer by targeting STAT3. *Oncotarget*. 2015;6:25266-80.
133. Christaki E, Diza E, Giamarellos-Bourboulis EJ, Papadopoulou N, Pistiki A, Droggiti DI, *et al*. NK and NKT Cell Depletion Alters the Outcome of Experimental Pneumococcal Pneumonia: Relationship with Regulation of Interferon-gamma Production. *J Immunol Res*. 2015;2015:532717.
134. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, McGuire F, Nagarkatti PS, *et al*. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo*. 2013;27:669-84.
135. Banerjee S, Cui H, Xie N, Tan Z, Yang S, Icyuz M, *et al*. miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation. *J Biol Chem*. 2013;288:35428-36.
136. Coppola N, Potenza N, Pisaturo M, Mosca N, Tonziello G, Signoriello G, *et al*. Liver microRNA hsa-miR-125a-5p in HBV chronic infection: correlation with HBV replication and disease progression. *PLoS One*. 2013;8:e65336.
137. Hayes CN, Chayama K. MicroRNAs as Biomarkers for Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2016;17:280.
138. Jin J, Wang Y, Xu Y, Zhou X, Liu Y, Li X, *et al*. MicroRNA-144 regulates cancer cell proliferation and cell-cycle transition in acute lymphoblastic leukemia through the interaction of FMN2. *J Gene Med*. 2017;19.
139. Shao Y, Li P, Zhu ST, Yue JP, Ji XJ, Ma D, *et al*. MiR-26a and miR-144 inhibit proliferation and metastasis of esophageal squamous cell cancer by inhibiting cyclooxygenase-2. *Oncotarget*. 2016;7:15173-86.

140. Rosenberger CM, Podyminogin RL, Diercks AH, Treuting PM, Peschon JJ, Rodriguez D, *et al.* miR-144 attenuates the host response to influenza virus by targeting the TRAF6-IRF7 signaling axis. *PLoS Pathog.* 2017;13:e1006305.
141. Lv Y, Guo S, Li XG, Chi JY, Qu YQ, Zhong HL. Sputum and serum microRNA-144 levels in patients with tuberculosis before and after treatment. *Int J Infect Dis.* 2016;43:68-73.
142. Kim JK, Lee HM, Park KS, Shin DM, Kim TS, Kim YS, *et al.* MIR144* inhibits antimicrobial responses against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes and macrophages by targeting the autophagy protein DRAM2. *Autophagy.* 2017;13:423-41.
143. Keller A, Leidinger P, Vogel B, Backes C, ElSharawy A, Galata V, *et al.* miRNAs can be generally associated with human pathologies as exemplified for miR-144. *BMC Med.* 2014;12:224.
144. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:606-25.
145. Caserta S, Kern F, Cohen J, Drage S, Newbury SF, Llewelyn MJ. Circulating Plasma microRNAs can differentiate Human Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *Sci Rep.* 2016;6:28006.
146. Cao B, Zhou X, Ma J, Zhou W, Yang W, Fan D, *et al.* Role of MiRNAs in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci.* 2017;62:1426-38.
147. Trino S, Lamorte D, Caivano A, Laurenzana I, Tagliaferri D, Falco G, *et al.* MicroRNAs as New Biomarkers for Diagnosis and Prognosis, and as Potential Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2018;19.
148. Romaine SP, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart.* 2015;101:921-8.

149. Zheng J, Zhou Z, Xu Z, Li G, Dong P, Chen Z, *et al.* Serum microRNA-125a-5p, a useful biomarker in liver diseases, correlates with disease progression. *Mol Med Rep.* 2015;12:1584-90.
150. Caserta S, Mengozzi M, Kern F, Newbury SF, Ghezzi P, Llewelyn MJ. Severity of Systemic Inflammatory Response Syndrome Affects the Blood Levels of Circulating Inflammatory-Relevant MicroRNAs. *Front Immunol.* 2017;8:1977.
151. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10:57-63.
152. Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, *et al.* The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science.* 2008;320:1344-9.
153. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods.* 2008;5:621-8.
154. Keller A, Leidinger P, Steinmeyer F, Stahler C, Franke A, Hemmrich-Stanisak G, *et al.* Comprehensive analysis of microRNA profiles in multiple sclerosis including next-generation sequencing. *Mult Scler.* 2014;20:295-303.
155. Rajkumar AP, Qvist P, Lazarus R, Lescai F, Ju J, Nyegaard M, *et al.* Experimental validation of methods for differential gene expression analysis and sample pooling in RNA-seq. *BMC Genomics.* 2015;16:548.
156. Mary-Huard T, Daudin JJ, Baccini M, Biggeri A, Bar-Hen A. Biases induced by pooling samples in microarray experiments. *Bioinformatics.* 2007;23:i313-8.
157. Shih JH, Michalowska AM, Dobbin K, Ye Y, Qiu TH, Green JE. Effects of pooling mRNA in microarray class comparisons. *Bioinformatics.* 2004;20:3318-25.

158. Kendzierski CM, Zhang Y, Lan H, Attie AD. The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. *Biostatistics*. 2003;4:465-77.
159. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al*. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55:611-22.
160. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*. 2004;37:112-4, 6, 8-9.
161. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, *et al*. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;141:672-5.
162. de Gonzalo-Calvo D, Iglesias-Gutierrez E, Llorente-Cortes V. Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2017;70:763-9.

VIII. ANEXOS

ANEXO I

Formulario de recogida de datos Candidemia											
Datos del caso											
1	Número de Hemocultivo (indispensable para continuar):										
2	Si se incluye en estudio de miRNA indicar CAN:										
3	Nombre:										
4	Primer apellido:				5	Segundo apellido:					
6	Número de historia clínica (indispensable):										
7	Fecha de nacimiento: __/__/____				8	Fecha de ingreso: __/__/____					
9	Sexo <input type="checkbox"/> Mujer <input type="checkbox"/> Hombre										
10	Fecha de hemocultivo: __/__/____				11	Nº HC practicados:		12	Nº HC positivos:		
13	Servicio:										
Germen											
14	Germen 1:	Sensibilidad				24	Germen 2:	Sensibilidad			
		S	I	R				S	I	R	
15	Anidulafungina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		25	Anidulafungina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
16	Micafungina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		26	Micafungina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
17	Caspofungina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		27	Caspofungina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
18	5 Fluocitosina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		28	5 Fluocitosina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
19	Pozaconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		29	Pozaconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
20	Voriconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		30	Voriconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
21	Itraconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		31	Itraconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
22	Fluconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		32	Fluconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
23	AnfotericinaB	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		33	AnfotericinaB	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Factores de riesgo											
34	Enfermedad de base 1:										
35	Enfermedad de base 2:										
36	Enfermedad de base 3:										
37	Procedencia	<input type="checkbox"/> Casa	<input type="checkbox"/> Residencia	<input type="checkbox"/> Hospital							
38	Ingreso previo	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
39	Origen fungemia	<input type="checkbox"/> Extrahospitalaria	<input type="checkbox"/> Nosocomial	<input type="checkbox"/> Asociada a cuidados sanitarios							
40	Pronóstico	<input type="checkbox"/> No fatal	<input type="checkbox"/> Finalmente fatal	<input type="checkbox"/> Rápidamente fatal							
41	Manipulaciones	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	42	Tipo manipulación:						
43	Cirugía	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	44	Tipo de cirugía:						
45	Fecha de cirugía: __/__/____										
46	Drenajes	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
47	Profilaxis	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, indicar antibiótico utilizado:								
48	UCI previa	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
49	Fecha ingreso UCI: __/__/____				50	Fecha alta UCI: __/__/____					
51	ITVM previa	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
52	Fecha inicio ITVM: __/__/____				53	Fecha fin ITVM: __/__/____					
54	Quimioterapia	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
55	Sonda urinaria	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
56	Flebre	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
57	Fecha inicio fiebre: __/__/____				58	Fecha fin fiebre: __/__/____					
59	Shock	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
60	CID	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
61	SDRA	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
62	Catéter vascular	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
63	Fecha inicio catéter: __/__/____				64	Fecha fin catéter: __/__/____					
65	Tipo de catéter:										
66	Catéter de diálisis	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
67	Perfusión	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Suero	<input type="checkbox"/> Nutrición parenteral							
68	Fecha inicio NP: __/__/____				69	Fecha fin NP: __/__/____					
70	Flebitis	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
71	Infección punto I.	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
72	Fungemia NP	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
73	Fungemia primaria	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
74	Transfusión	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí								
75	Inmunosupresión	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	76	Tipo inmunosupresores:						

77	Corticoides	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí		
78	Granulopenia	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	79	Menor cifra granulocitos:
Alergia					
80	Alergia	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	81	Indicar a cuál antibiótico:
Analíticas					
82	Fecha 1ª analítica: __/__/_____			88	Fecha 2ª analítica (3ª-5ª día): __/__/_____
83	Leucocitos 1ª:			89	Leucocitos 2ª:
84	Neutrófilos 1ª:			90	Neutrófilos 2ª:
85	PCR 1ª:			91	PCR 2ª:
86	PCT 1ª:			92	PCT 2ª:
87	Creatinina 1ª:			93	Creatinina 2ª:
Antibióticos					
94	ATB previo1	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	95	Indicar cuál antibiótico:
96	ATB previo2	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	97	Indicar cuál antibiótico:
98	ATB previo3	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	99	Indicar cuál antibiótico:
100	ATB durante1	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	101	Indicar cuál antibiótico:
102	ATB durante2	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	103	Indicar cuál antibiótico:
104	ATB durante3	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	105	Indicar cuál antibiótico:
106	ATB empírico1	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	107	Indicar cuál antibiótico:
108	ATB empírico2	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	109	Indicar cuál antibiótico:
110	ATB empírico3	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	111	Indicar cuál antibiótico:
112	Fecha inicio ATB empírico: __/__/_____				
113	ATB definitivo1	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	114	Indicar cuál antibiótico:
115	ATB definitivo2	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	116	Indicar cuál antibiótico:
117	ATB definitivo3	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	118	Indicar cuál antibiótico:
119	Fecha inicio ATB definitivo: __/__/_____				
120	¿ATB correcto?	Empírico <input type="checkbox"/> No hay datos <input type="checkbox"/> Sí se administró y fue incorrecto <input type="checkbox"/> Sí se administró y fue correcto <input type="checkbox"/> No se administró	Definitivo <input type="checkbox"/> No hay datos <input type="checkbox"/> Sí se administró y fue incorrecto <input type="checkbox"/> Sí se administró y fue correcto <input type="checkbox"/> No se administró <input type="checkbox"/> Exitus antes de conocer sensibilidad		
Foco					
121	Foco (seleccionar de la lista, ver diccionario):				
122	Cultivo del foco	<input type="checkbox"/> NOP: no hay cultivo del foco. <input type="checkbox"/> NEG: hay cultivo del foco sospechoso, pero es negativo <input type="checkbox"/> POS: hay cultivo del foco sospechoso y es positivo <input type="checkbox"/> NOV: no valorable. Casos que no se encuadran en ninguno de los previos			
123	Tipo de foco	<input type="checkbox"/> Seguro	<input type="checkbox"/> Probable	<input type="checkbox"/> Posible	<input type="checkbox"/> Desconocido
124	Metástasis	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí	125	Indicar tipo metástasis:
Evolución					
126	Exitus	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí, relacionado	<input type="checkbox"/> Sí, pero no relacionado	
127	Fecha de alta/exitus: __/__/_____				
128	¿Se confirmó mediante hemocultivo la desaparición de la candidemia?	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí		
129	Fecha de primer hemocultivo de control negativo (fecha de negativización): __/__/_____				
130	¿El último hemocultivo de control fue positivo?	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí		
131	Fecha de último hemocultivo de control positivo: __/__/_____				
132	Ingreso en UCI posterior a la fecha de candidemia	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí		
133	Necesidad de intubación /Ventilación posterior a la fecha de candidemia	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí		
134	Infección bacteriana asociada (- 7 d a + 30 d)	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí		
135	Otros cultivos positivos	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí		
136	Describir los otros cultivos positivos asociados a candidemia:				
137	Toxicidad a antifúngico	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí		
138	Describir la toxicidad a antifúngico:				

Índice de Charlson		No	Sí			No	Sí
139	Infarto de miocardio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	149	Hemiplejía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
140	Insuf. Cardíaca congestiva	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	150	Enf. Renal moderada-grave	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
141	Enf. Vascul. periférica (incluye aneurisma >6cm)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	151	DM con lesión de órgano diana	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
142	Enf. Cerebrovascular	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	152	Tumor sólido sin metástasis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
143	Demencia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	153	Leucemia aguda o crónica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
144	EPOC	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	154	Linfoma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
145	Enf. Tejido Conectivo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	155	Enf. Hepática moderada-grave	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
146	Úlcus péptico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	156	Tumor sólido con metástasis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
147	Hepatopatía leve (s/HTP, incluye hepatitis crónica)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	157	SIDA (se excluye si solo VIH +)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
148	DM sin lesión de órgano diana	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
Chronic Disease Score (CDS)							
Chronic Condition	Medication class(es)			Scoring rule			
Heart disease	(a) Anticoagulants, hemostatics (b) Cardiac agents, ACE+ inhibitors (c) Diuretic loop			<input type="checkbox"/> No=0 <input type="checkbox"/> One class = 3 <input type="checkbox"/> Two classes = 4 <input type="checkbox"/> Three classes = 5			
Respiratory illness	(a) Isoproterenol (b) Beta- adrenergic, miscellaneous (c) Xanthine products (d) Respiratory products including bronchodilators and mucolytics but excluding cromolyn (e) Epinephrine			<input type="checkbox"/> No=0 <input type="checkbox"/> One class = 2 <input type="checkbox"/> Two or more classes = 3			
Asthma, rheumatism	Glucocorticoids			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> Score = 3		
Rheumatoid arthritis	Gold salts, chloroquine, et(c)			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> Score = 3		
Cancer	Antineoplastics			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> Score = 3		
Parkinson's disease	L-dopa			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> Score = 3		
Hypertension	(a) Antihypertensives (except ACE inhibitors) or calcium channel blockers (b) Beta-blockers, diuretics			<input type="checkbox"/> No=0 <input type="checkbox"/> If class (a) = 2 <input type="checkbox"/> If class (b) and not (a) = 1			
Diabetes	(a) Insulin or oral hypoglycemics			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> Any class = 2		
Epilepsy	Anticonvulsants			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> Score = 2		
Asthma, rhinitis	Cromolyn, leukotriene, antirhinitis, et(c)			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> Score = 2		
Acne	(a) Antiacne tretinoin (b) Tropical acne antibiotics			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> (a) or (b) = 1		
Ulcers	Histamine2-blockers, proton pump inhibitors, sucralfate			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> Score = 1		
Glaucoma	Ophthalmic miotics			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> Score = 1		
Gout, hyperuricemia	Uric acid agents			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> Score = 1		
High cholesterol	Antilipemics			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> Score = 1		
Migraines	Ergot derivatives, etc.			<input type="checkbox"/> No=0	<input type="checkbox"/> Score = 1		
Pitt bacteremia score							
Criterio	Puntuación						
Fiebre (temperatura axilar)	<input type="checkbox"/> ≤ 34,4° o ≥ 39,4° (2)		<input type="checkbox"/> 34,5° - 35,4° Ó 38,4° - 39,3 (1)		<input type="checkbox"/> 35,5° - 38,3° (0)		
Hipotensión	<input type="checkbox"/> Evento hipotensivo agudo con bache en la PAS > 30 mmHg y en la PAD >20 mmHg OR necesidad de drogas vasopresoras OR PAS < 90 mmHg (2)						
Ventilación mecánica	<input type="checkbox"/> No			<input type="checkbox"/> Sí (2)			
Parada cardíaca	<input type="checkbox"/> No			<input type="checkbox"/> Sí (4)			
Estado mental	<input type="checkbox"/> Alerta (0)		<input type="checkbox"/> Desorientado (1)		<input type="checkbox"/> Estuporoso (2)		<input type="checkbox"/> Comatoso (4)
Puntuación de Child							
Encefalopatía hepática	<input type="checkbox"/> No		<input type="checkbox"/> Grado I-II		<input type="checkbox"/> Grado III-IV		
Ascitis	<input type="checkbox"/> No		<input type="checkbox"/> Buena respuesta al tratamiento		<input type="checkbox"/> Mala respuesta al tratamiento		
Bilirrubina (mg/dL)	<input type="checkbox"/> < 2		<input type="checkbox"/> 2-3		<input type="checkbox"/> >3		
Albúmina (g/dL)	<input type="checkbox"/> > 3,5		<input type="checkbox"/> 2,8 - 3,5		<input type="checkbox"/> < 2,8		
Protrombina (%)	<input type="checkbox"/> > 50		<input type="checkbox"/> 30 - 50		<input type="checkbox"/> < 30		

ANEXO II

HOJA DE INFORMACIÓN A PACIENTES

TÍTULO DEL PROYECTO: Estudio de comorbilidad y otros factores asociados con mortalidad en la bacteriemia nosocomial en el Hospital Universitario de Salamanca

Nos dirigimos a usted para invitarle a participar en este estudio que se desarrolla en el Hospital Universitario de Salamanca sobre los factores asociados con mortalidad en la bacteriemia.

El objetivo de este estudio es analizar por qué, ante una infección determinada, la evolución de unos pacientes es diferente a la de otros. Poder avanzar en el conocimiento de estos aspectos resulta clave para mejorar el tratamiento de estas infecciones así como poder prevenirlas.

Tendrá la oportunidad de hablar con su médico para aclarar todas sus dudas, y, tanto si decide participar como no participar en el estudio, esto no afectaría en ningún modo a la calidad de sus cuidados médicos futuros. Si usted desea participar, se le extraerá una pequeña cantidad de sangre que permita el almacenamiento de productos derivados (suero y ácido ribonucleico [ARN]) con los que realizar en un futuro estudios de investigación.

Del suero y del ARN podremos estudiar la forma en que su organismo responde a la infección, investigando sustancias o productos sanguíneos que puedan explicar el curso y desarrollo de su enfermedad.

La toma de muestra de sangre se realizará en el momento en que se realice otro análisis de sangre que usted precise por su cuidado clínico habitual. De esta forma, no se producen inconvenientes añadidos. Como probablemente conoce, la extracción de sangre puede provocar una molestia en el punto en que se introduce la aguja en la piel, y a veces le puede ocasionar un pequeño hematoma que suele desaparecer en pocos días; y, ocasionalmente, puede producir mareo.

Se le pide su consentimiento para que con las muestras extraída se realice:

1. - Un **almacenamiento de muestras** (ARN y suero) por un tiempo indefinido, para que estén disponibles para la realización de estudios de investigación y conseguir un mejor conocimiento sobre su enfermedad. Si usted autoriza el almacenamiento de las muestras, éstas serán guardadas en parte en nuestro Hospital y en parte el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca. En dichas muestras no constará ningún dato de identificación personal y no será posible llegar a conocer su identidad a partir de cada muestra. Cada una de las muestras recibirá un número y nunca el personal investigador que lleve a cabo el estudio analítico conocerá su identidad.

2. – **Análisis y estudios en dichas muestras** que puedan aportar información sobre la infección que usted padece.

Su participación es voluntaria y usted es libre de solicitar la retirada de sus muestras en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre su tratamiento futuro. En este caso, se procedería a la destrucción de la muestra codificada.

Los resultados de las investigaciones y análisis de sus muestras están sometidos a la confidencialidad que da cobertura a todo el estudio. Sus resultados junto con los del resto de participantes, supondrán una fuente valiosa de información que revertirá en un mejor conocimiento de la enfermedad, con la consiguiente mejora de forma indirecta del cuidado. Sin embargo, los datos obtenidos de las muestras no le serán comunicados ni a usted ni a su médico, excepto en el caso de que los hallazgos tengan implicación significativa en la salud de los participantes y exista una posibilidad real de mejora de su condición de salud. Los resultados serán analizados por grupos de investigadores y expertos.

Los resultados de los análisis realizados podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas, manteniéndose la confidencialidad y no pudiendo ser identificados los pacientes.

No dude en recabar más información o en hablar con su médico para aclarar cualquier duda, tanto al inicio del estudio como en cualquier momento a lo largo del mismo.

Agradecemos su colaboración.

HOJA DE CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Yo,

con DNI nº

Declaro que:

1. He leído la hoja de información que me ha sido entregada
2. He podido hacer preguntas sobre la obtención de sangre, almacenamiento y análisis de las muestras.
3. He hablado y he aclarado las dudas con el Dr.
4. Comprendo que mi participación es voluntaria.
5. Comprendo que puedo solicitar la destrucción de mis muestras en cualquier momento sin que esto repercuta en mis cuidados médicos futuros.
6. Presto libremente mi conformidad para que se realice la obtención de las muestras, y lo estipulado en el punto 1 y 2 de la Hoja de Información.

Fecha

Firma del participante

The Pitt Bacteremia Score, Charlson Comorbidity Index and Chronic Disease Score are useful tools for the prediction of mortality in patients with *Candida* bloodstream infection

María Paz Vaquero-Herrero¹ | Silvio Ragozzino^{1,3} | Fabián Castaño-Romero¹ |
María Siller-Ruiz² | Rebeca Sánchez González¹ | José Elías García-Sánchez^{2,3,4} |
Inmaculada García-García^{2,3} | Miguel Marcos^{1,3,4} | Hugo Guillermo Ternavasio-de la Vega^{1,3} 

¹Department of Internal Medicine, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

²Department of Microbiology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

³Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

⁴University of Salamanca (USAL), Salamanca, Spain

Correspondence

Hugo Guillermo Ternavasio-de la Vega,
Servicio de Medicina Interna, Hospital Clínico de Salamanca, Salamanca, Spain.
Email: hgternavasio@saludcastillayleon.es

Funding information

This work was supported by the Castilla León Regional Health Authority (Gerencia Regional de Salud de Castilla y León; grant GRS881/A/13) to H.G.T.V.; and by a grant from the Institute of Biomedical Research of Salamanca IBI14/0001 to M.M.

Summary

Candida bloodstream infection (CBI) is associated with high mortality. The aim of this study was to compare the utility of the combined use of the Pitt Bacteremia Score (PBS) and Charlson Comorbidity Index (CCI) or Chronic Disease Score (CDS) to predict mortality among patients with CBI. Thereby, all consecutive patients with CBI at our institution between 2010 and 2014 were included. The PBS was used to evaluate CBI severity and the CCI and CDS were used to assess comorbidities of patients with CBI. Logistic regression analysis was used to estimate odds ratios for 30-day mortality in models including the PBS and CCI or CDS. A total of 189 CBI episodes were identified. Logistic regression models including the PBS and either CCI or CDS showed that the combined use of a comorbidity score and a severity score significantly predicted 30-day mortality. The performance of the different models was similar. Aggregated scores of comorbidity (CCI and CDS) and disease severity (PBS) are useful for the prediction of 30-day mortality risk in patients with CBI. Their use may facilitate the analysis of risk factors for poorer outcome and the development of an index for CBI mortality.

KEYWORDS

candidaemia, Charlson Comorbidity Index, Chronic Disease Score, mortality, Pitt Bacteremia Score

1 | INTRODUCTION

Candida bloodstream infection (CBI) is particularly frequent in the nosocomial setting,¹ and its incidence has increased notably in recent decades² due to changes in patients' demographic characteristics and the increased prevalence of risk factors, such as aggressive treatments and invasive procedures.³ Despite diagnostic and therapeutic efforts, overall mortality remains high, ranging from 30% to 50%.^{4,5} Multiple factors are associated with a higher mortality risk, including:

(i) patient-related factors, such as age and comorbid conditions;³ (ii) infection-related factors, such as the source of candidaemia,³ species of *Candida*⁴ involved and development of septic shock;⁶ and (iii) treatment-related factors, such as delay of appropriate antimicrobial treatment.⁴

Although the prediction of mortality in patients with severe CBI is of paramount importance, the inclusion and consideration of all of the abovementioned factors in predictive multivariable models is very difficult. Even with large samples, the risk of overfitting,^{7,8} among other potential biases, exists. In this setting, the combination of several risk factors in aggregate measures of comorbidity or severity may be useful for the prediction of mortality.^{7,8}

Vaquero-Herrero and Ragozzino contributed equally as first authors to this manuscript.

Marcos and Ternavasio-de la Vega contributed equally as senior authors to this manuscript.

Examples of aggregated measures used as prognostic indicators for other diseases to identify high-risk patients and thus adequately direct therapeutic efforts are the Charlson Comorbidity Index (CCI),⁹ Chronic Disease Score (CDS)¹⁰ and Pitt Bacteremia Score (PBS).¹¹ The first two scores are comorbidity measures. The CCI was originally developed to predict mortality among the general population of hospitalised patients and was then validated in other subgroups (eg patients with cancer^{9,12} or those with bloodstream infection due to *Staphylococcus aureus*¹³). The CDS is an aggregated prescription-based comorbidity score^{10,14,15} that was originally validated as a predictor of hospitalisation and mortality, among other outcomes,¹⁵ but it has rarely been used in the setting of infectious diseases.^{8,16} The PBS is an index used to assess the severity of infection and mortality risk in patients with bacteremia.¹¹ To the best of our knowledge, the ability of these scores to predict mortality among patients with CBI has not been simultaneously evaluated. Hence, the aim of this study was to assess the ability of comorbidity indexes, such as the CCI and CDS, in conjunction with the PBS as a severity index, to predict 30-day mortality in patients with CBI.

2 | METHODS

This study was conducted at the University Hospital of Salamanca in Spain, a 900-bed centre that serves a population of about 350,000 inhabitants. All episodes of CBI detected in the Microbiology Department in patients older than 18 years were included and followed. Data regarding episodes were collected retrospectively from January 2010 until May 2011 and assessed prospectively from June 2011 to October 2014. Clinical and microbiological data, as well as outcome information, were obtained.

2.1 | Definition of terms

Candidaemia was defined as at least one positive blood culture for *Candida* spp.³ with symptoms and signs of sepsis. An episode of candidaemia was considered nosocomial if it took place ≥ 72 hours after admission, and healthcare related if the patient had been hospitalised within 1 month before the current admission or had received long-term healthcare (eg haemodialysis, parenteral treatment as part of a day hospital regimen, nursing home stay); otherwise, it was considered to be community acquired. Comorbidity was defined as a disease that could alter defence mechanisms and predispose a patient to infection, such as active neoplastic disease, diabetes, connective tissue disease, transplant receipt, liver cirrhosis and renal failure. The source of infection was determined according to the patient's medical history and the findings of physical examination and complementary tests. An intravenous catheter was considered to be the source of candidaemia when, in the absence of another clinically apparent focus, any of the following criteria was present: (i) local inflammatory signs, (ii) suppuration at the insertion site, and/or (iii) a positive culture of the catheter tip with the same *Candida* spp. as that isolated in peripheral blood. Secondary CBI was defined as a case that occurred

after a potential source of infection was identified. Crude 30-day mortality was recorded.

2.2 | Risk scores

The CCI, CDS and PBS were calculated according to scoring method instructions (Table 1). The CCI and CDS were completed according to the presence of specified chronic diseases⁹ and pharmaceutical prescriptions,¹⁰ respectively, as recorded in patient notes at the time of admission. According to the PBS, the severity of disease was calculated using mental status, need for ventilation and certain vital signs.¹¹ The parameters used for the PBS were assessed and recorded from 2 days before to the day of the first positive blood culture, and the highest score for each patient during that time was used for analyses.¹⁷

2.3 | Microbiological methods

CBI was diagnosed using BACTEC 9240 blood cultures (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). When the blood culture incubation device reported that a blood culture was positive, Gram staining was performed to check microorganism growth. The blood culture was plated onto blood agar, MacConkey agar, chocolate agar and Sabouraud agar plates. If Gram staining confirmed the presence of yeast, the blood was plated additionally onto Brilliance Candida agar (Oxoid, Hampshire, UK). From 2010 to 2012, *Candida* was identified using biochemical and enzymatic methods (RapID Yeast Plus System [Remel, Waltham, MA, USA]). From 2012 to 2014, *Candida* isolates were identified by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Identification was considered to be reliable to the species level when the score was ≥ 2 . Catheter infection was identified by rolling the catheter tip several times onto the surfaces of blood agar plates (Maki method).¹⁸ The broth microdilution colorimetric method (Sensititre YeastOne, Thermo Scientific [Waltham, MA, USA]) was used to check for susceptibility to antifungal drugs, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines.¹⁹

2.4 | Statistical analysis

Continuous variables were expressed as means and standard deviations (SDs), and compared using Student's *t*-test. Categorical variables were expressed as frequencies and percentages, and compared using the Chi-squared test, or Fisher's exact test when necessary. Logistic regression models were used to predict 30-day mortality risk. Relevant risk and protective factors with *P* values $\leq .20$ in univariate analyses, and variables previously and consistently associated with mortality, were analysed using multivariable stepwise logistic regression to determine the independent factors associated with 30-day mortality. The 30-day mortality odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals were calculated (95% CI). Variables included in CCI or CDS comorbidity scores or the PBS severity index were not included individually, but were aggregated in these scores to test their validity in multivariable analyses. The CCI and CDS were analysed in separate models to avoid multicollinearity. For the same reason,

TABLE 1 Components and scoring systems for Charlson Comorbidity Index, Chronic Disease Score and Pitt Bacteremia Score

Charlson Comorbidity Index ^a		Chronic Disease Score ^b			Pitt Bacteremia Score ^c	
Condition	Score	Condition		Score	Condition	Score
					Fever (°C)	
Myocardial infarction	1	Heart disease	(a) Anticoagulants, hemostatics	One class=3	≤34.4 or ≥39.4	
Heart failure	1		(b) Cardiac agents, ACE inhibitors	Two classes=4	34.5-35.4 or 38.4-39.3	2
Peripheral vascular disease	1		(c) Diuretic loop	Three classes=5	35.5-38.3	1
Cerebrovascular disease	1	Respiratory illness	(a) Isoproterenol	One class=2	Hypotension	0
Dementia	1		(b) Beta-adrenergic, miscellaneous	Two or more classes=3	Mechanical ventilation	2
Chronic pulmonary disease	1		(c) Xanthine products		Cardiac arrest	2
Connective tissue disease	1		(d) Respiratory products including bronchodilators and mucolytics not cromolyn		Mental status	4
Peptic ulcer	1		(e) Epinephrine			
Mild liver disease	1	Asthma, rheumatism	Glucocorticoids	3	Alert	0
Diabetes	1	Rheumatoid arthritis	Gold salts, chloroquine	3	Confused	1
Diabetes with end organ damage	2	Cancer	Antineoplastics	3	Stuporous	2
Hemiplegia	2	Parkinson's disease	L-dopa	3	Comatose	4
Moderate or severe renal disease	2	Hypertension	(a) Antihypertensives (except ACE inhibitors or calcium channel blockers)	If class (a)=2		
Any tumour	2		(b) Beta-blockers, diuretics	If class (b) and not (a)=1		
Leukaemia	2	Diabetes	Insulin or oral hypoglycemics	Any class=2		
Lymphoma	2	Epilepsy	Anticonvulsants	2		
Moderate or severe liver disease	3	Asthma, rhinitis	Cromolyn, leukotriene	2		
Metastatic solid tumour	6	Acne	(a) Antiacne tretinoin	Either class with two or more prescriptions=1		
AIDS	6		(b) Topical antiacne antibiotics			
		Ulcers	Histamine-blockers, proton pump inhibitors, sucralfate	1		
		Glaucoma	Ophthalmic miotics	1		
		Gout, hyperuricemia	Uric acid agents	1		
		High cholesterol	Antilipemics	1		
		Migraines	Ergot derivatives	1		
		Tuberculosis	Antitubercular agents	1		

Abbreviations: AIDS, acquired immune deficiency syndrome; ACE, angiotensin-converting enzyme.

^aAdapted from Charlson ME et al. *J Chronic Dis.* 1987;40:373-83.

^bAdapted from Von Korff M et al. *J Clin Epidemiol.* 1992;45:197-203.

^cAdapted from Paterson et al. *Ann Intern Med.* 2004;140:26-32.

PBS was the only score used to adjust for patient severity, instead of other scores (eg APACHE II or SOFA). Creatinine levels were included in the models assessing the CDS, as this score does not include any variable recording information on chronic or acute kidney disease. The CCI, CDS and PBS were included as continuous or dichotomised variables in different models (≤2 and ≥3 were used as cut-off CCI values,^{13,20} ≤3 and ≥4 were used for the CDS and ≤1 and ≥2 were used for the PBS^{21,22}). Thus,

four different models were tested with the following comorbidity and severity measures: CCI and PBS as continuous variables (model 1), CCI and PBS as categorical variables (model 2), CDS and PBS as continuous variables (model 3) and CDS and PBS as categorical variables (model 4). Sequential exclusion procedures were used for modelling, and the significance of each variable in the final model was obtained by the likelihood test. *P* values ≤.05 were considered to be significant. After fitting,

diagnostic tests were implemented to check the validity of the models. Global model fitting was compared using the likelihood function ($-2\log$ [maximum likelihood]) and the Akaike Information Criterion (AIC), which combines the likelihood function with the number of parameters. The model with the lowest AIC was considered to have the best fit.²³ Model calibration was compared using the Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test.²⁴ C statistics and their 95% confidence intervals (95% CIs) were estimated to compare the predictive validity of the models. spss version 20 (IBM Corporation) was used for statistical analysis.

3 | RESULTS

3.1 | Descriptive results

During the study period, 189 CBIs in 183 patients were included. Table 2 shows the main characteristics of the cases. The mean age was 69 (SD=16) years and 112 (60%) patients were male. One hundred and forty-nine (79%) episodes of CBI were hospital acquired and 27 (14%) were healthcare related. Most frequent comorbidities were oncological disease in 122 (64%) cases and chronic heart disease in 82 (43%) cases. The mean CCI and CDS were 3.3 (2.4) and 4.9 (3.3) respectively. A total of 102 (54%) cases had CCIs ≥ 3 and 121 (64%) cases had CDSs ≥ 4 . The most common CBI risk factors were previous antibiotic treatment (158 [84%] cases) and central venous catheter placement (122 [65%] cases). Ninety (48%) patients had urinary catheters and 80 (42%) cases had received blood component transfusions before blood cultures were drawn. The most frequent foci of CBI were vascular catheters (68 [36%] cases) and abdominal infections (31 [16%] cases). The focus was unknown in 71 (38%) cases. CBI episodes presented with shock in 36 (19%) cases. The mean PBS was 2.2 (SD=2.3), and 79 (42%) cases had PBSs ≥ 2 . At the onset of CBI, the mean granulocyte count was 7.70×10^3 (SD=6.66)/ μL and the mean creatinine level was 1.02 (SD=0.74) mg/dL.

A total of 194 *Candida* strains in 189 CBI episodes were isolated (five episodes had coinfection by two species). *Candida parapsilosis* was identified in 76 (40.2%) cases, *Candida albicans* in 75 (39.7%), *Candida glabrata* in 24 (12.7%), *Candida tropicalis* in 8 (4.2%), *Candida krusei* in 4 (2.1%), *Candida guilliermondii* in 2 (1.1%), *Candida lusitanae* in 1 (0.5%) and *Candida* spp. in 4 (2.1%) cases. Regarding antifungal susceptibility, 22 (12%) strains were resistant to azoles. According to the susceptibility of the isolates, 44 (23%) cases received appropriate empirical antifungal treatment. During follow-up, 24 (14%) cases were admitted to the intensive care unit (ICU) and 60 (32%) patients died within 30 days.

3.2 | Factors associated with 30-day mortality

Compared with survivors, patients who died within 30 days after CBI episodes were significantly older, had more comorbidities according to the CCI and CDS, were more severely ill according to the PBS, had higher creatinine and C-reactive protein levels and had higher frequencies of nosocomial infection acquisition, chronic kidney disease, central vascular catheter use, prior parenteral nutrition, urinary bladder catheter use and prior blood component transfusion (Table 2). Patients who

died were also more likely to present with shock, disseminated intravascular coagulation or adult respiratory distress syndrome. The distribution of *Candida* species did not differ between groups. Patients who survived had a higher neutrophil count and lower rate of appropriate empirical treatment than did patients who died within 30 days of CBI episodes, but these differences did not reach statistical significance.

3.3 | Relationship between PBS and 30-day mortality

The main characteristics of patients with PBS ≥ 2 were similar to those of patients with PBS ≤ 1 , except for a significantly lower burden of comorbidities according to the dichotomised CDS and significantly higher frequencies of previous invasive procedures, urinary catheterisation, blood component transfusion, prior ICU stay, associated bacterial isolation and appropriate empirical treatment (Table 3). The group with PBS ≥ 2 also had significantly higher creatinine levels and lower leucocyte and granulocyte counts. The crude 30-day mortality rate was significantly higher among patients with PBSs ≥ 2 (57% vs 18%, $P < .0001$).

3.4 | Relationship between CCI and 30-day mortality

The group with CCI ≥ 3 was similar to the group with CCI ≤ 2 , except for an obviously larger amount of comorbidities and higher prevalence of previous blood component transfusion, previous chemotherapy and unknown focus of infection (Table 3). The crude 30-day mortality rate was significantly higher among patients with CCI ≥ 3 (40% vs 22%, $P = .007$).

3.5 | Relationship between CDS and 30-day mortality

Compared with patients with CDS ≤ 3 , those with CDSs ≥ 4 were significantly older, had significantly more comorbidities and previous chemotherapy, and had significantly lower frequency of cases with PBS ≥ 2 (Table 3). The crude 30-day mortality rate was significantly higher among patients with CDS ≥ 4 (37% vs 22%, $P = .03$).

3.6 | Predictive multivariable models of 30-day mortality

The results of multivariable stepwise logistic regression analyses performed to identify independent factors associated with 30-day mortality and to evaluate whether the PBS, CCI and/or CDS (as continuous and/or dichotomous covariates) were associated independently with 30-day mortality are shown in Table 4. The combined use of PBS and CCI (as continuous [model 1] and dichotomous [model 2] variables) were significantly associated with 30-day mortality. Other variables identified in models 1 and 2 as independent risk factors for 30-day mortality were age, presence of a urinary catheter and previous blood component transfusion, whereas a higher neutrophil count was a significant protective factor. Models 1 and 2 showed good calibration and discrimination power (c statistic > 0.8), but model 1, which included the PBS and CCI as continuous variables, had the lowest AIC value. Similarly, the combined use of PBS and CDS (as continuous [model 3] and dichotomous [model 4] covariates) were associated

TABLE 2 Main characteristics of episodes of *Candida* bloodstream infection

	Total (n=189)	30-d Mortality		P
		No (n=129)	Yes (n=60)	
Age, y	68.7 (16.2)	66.9 (16.8)	72.3 (14.5)	.030
Sex: Male	112 (59.6)	74 (57.8)	38 (63.3)	.470
Origin of infection: Hospital acquired	149 (78.8)	94 (72.9)	55 (91.7)	.003
Previous admission (within 30 d)	39 (20.6)	27 (20.9)	12 (20.0)	.880
Department at the moment of CBI				.012
Medical units	49 (25.9)	28 (21.7)	21 (35.0)	
Surgical units	41 (21.7)	31 (24.0)	10 (16.7)	
Onco-haematology units	40 (21.2)	24 (18.6)	16 (26.7)	
Emergency department	40 (21.2)	35 (27.1)	5 (8.3)	
Intensive care units	19 (10.1)	11 (8.5)	8 (13.3)	
Solid neoplasm	88 (46.6)	58 (45.0)	30 (50.0)	.510
Chronic heart disease	82 (43.4)	49 (38.0)	33 (55.0)	.280
Diabetes	51 (27.0)	32 (24.8)	19 (31.7)	.320
Haematologic neoplasm	34 (18.0)	23 (17.8)	11 (18.3)	.930
Chronic lung disease	17 (9.0)	11 (8.5)	6 (10.0)	.740
Chronic liver disease	15 (7.9)	10 (7.8)	5 (8.3)	.890
Chronic kidney disease	13 (6.9)	5 (3.9)	8 (13.3)	.017
HIV infection	3 (1.6)	2 (1.6)	1 (1.7)	>.999
Solid organ transplantation	2 (1.1)	0 (0.0)	2 (3.3)	.100
CCI score	3.3 (2.4)	3.0 (2.3)	4 (2.7)	.130
CCI≥3 points	102 (54.0)	61 (47.3)	41 (68.3)	.007
CDS	4.9 (3.3)	4.4 (3.1)	6.0 (3.6)	.002
CDS≥4 points	121 (64.0)	76 (58.9)	45 (75.0)	.030
Presence of any vascular catheter	166 (87.8)	110 (85.3)	56 (93.3)	.115
Presence of CVC	122 (64.6)	76 (58.9)	46 (76.7)	.018
Previous antibiotic treatment (30 d)	158 (84.0)	104 (81.2)	54 (90.0)	.127
Parenteral nutrition	114 (60.3)	70 (54.3)	44 (73.3)	.013
Previous invasive procedure	111 (58.7)	74 (57.4)	37 (61.7)	.570
Previous urinary catheter	90 (47.6)	52 (40.3)	38 (63.3)	.003
Previous blood components transfusion	80 (42.3)	43 (33.3)	37 (61.7)	<.001
Previous surgery	64 (33.9)	42 (32.6)	22 (32.6)	.570
Chemotherapy	40 (21.2)	25 (19.4)	15 (25.0)	.370
Previous ICU stay	35 (18.5)	23 (17.8)	12 (20.0)	.720
Previous mechanical ventilation	28 (14.8)	17 (13.2)	11 (18.3)	.350
Receipt of corticosteroids	25 (13.2)	16 (12.4)	9 (15.0)	.620
Neutropenia	19 (10.1)	10 (7.8)	9 (15.0)	.123
Bone marrow transplantation	18 (9.5)	12 (9.3)	6 (10.0)	.870
Foci				
Unknown focus	71 (37.6)	47 (36.4)	24 (40.0)	.638
Catheter focus	68 (36.0)	46 (35.7)	22 (36.7)	.890
Abdominal focus	31 (16.4)	21 (16.3)	10 (16.7)	.947
Urinary focus	16 (8.5)	12 (9.3)	4 (6.7)	.780
Biliary focus	2 (1.1)	2 (1.6)	0 (0.0)	>.999
Other focus	1 (0.5)	1 (0.8)	0 (0.0)	>.999

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

	Total (n=189)	30-d Mortality		P
		No (n=129)	Yes (n=60)	
Temporary associated bacterial isolation (± 2 d)	114 (60.3)	73 (56.6)	41 (68.3)	.124
CBI-related shock	36 (19.0)	16 (12.4)	20 (33.3)	.001
CBI-related ARDS	17 (9.0)	6 (4.7)	11 (18.3)	.002
CBI-related embolic phenomena	15 (7.9)	12 (9.3)	3 (5.0)	.308
CBI-related DIC	5 (2.6)	1 (0.8)	4 (6.7)	.036
PBS	2.2 (2.3)	1.6 (2.0)	3.5 (2.7)	<.001
PBS ≥ 2 points	79 (41.8)	39 (30.2)	40 (66.7)	<.001
Leucocytes related to CBI ($\times 10^3$ /uL)	9.33 (7.38)	9.79 (7.40)	8.35 (7.31)	.213
Granulocytes related to CBI ($\times 10^3$ /uL)	7.70 (6.66)	8.06 (6.90)	6.94 (6.09)	.283
CRP related to CBI, mg/dL	11.6 (9.8)	9.9 (9.2)	15.2 (10.2)	.001
Creatinine related to CBI, mg/dL	1.02 (0.74)	0.89 (0.56)	1.28 (0.97)	.006
Positive <i>Candida</i> blood culture during follow-up	62 (32.8)	42 (32.6)	20 (33.3)	.916
Appropriate empirical treatment	44 (23.3)	25 (19.4)	19 (31.7)	.630
Persistent candidaemia	42 (22.7)	30 (23.3)	12 (21.4)	.785
ICU admission after CBI	24 (13.5)	14 (11.3)	10 (18.5)	.194
Mechanical ventilation after CBI	22 (12.3)	12 (9.6)	10 (18.5)	.095

Data are expressed as n (%) for categorical variable and mean (SD) for continuous variables.

Abbreviations: CBI, *Candida* bloodstream infection; HIV, human immunodeficiency virus; CCI, Charlson Comorbidity Index; CDS, Chronic Disease Score; CVC, Central vascular catheter; ICU, intensive care unit; DIC, disseminated intravascular coagulation; ARDS, acute respiratory distress syndrome; PBS, Pitt Bacteremia Score; CRP, C-reactive protein.

significantly with 30-day mortality in multivariable analyses adjusted for other variables. Model 3, which included the PBS and CDS as continuous variables, was the most parsimonious and had the lowest AIC value. This model also showed that creatinine levels and previous blood component transfusion were significant risk factors for 30-day mortality, whereas the neutrophil count was a significant protective factor. The calibration and predictive power of models 3 and 4 were similar. Finally, the c statistics for the models including only age, CCI and PBS (as continuous and dichotomous variables) were 0.77 (95% CI: 0.70-0.85) and 0.75 (95% CI: 0.68-0.82) respectively.

4 | DISCUSSION

The most important result of our study is that aggregated measures of comorbidity (CCI and CDS) and disease severity (PBS) are useful for the prediction of 30-day mortality risk in patients with CBI. We found no previous study that simultaneously compared the predictive abilities of the CCI, CDS and PBS in this setting.

The PBS has been consistently demonstrated to be a predictor of mortality in patients with bacteraemia in different situations,^{25,26} and it has been shown to be a better and simpler estimator of severity than the APACHE II score.¹¹ The OR for mortality of PBS as a continuous variable (~1.4 combined with CCI or CDS) is comparable to those reported in other studies involving bloodstream infections.^{25,27} In addition, two

studies of patients with CBI have used PBS ≥ 2 as a cut-off value to assess the risk of mortality^{21,22} and calculated ORs for mortality (4.10²¹ and 6.21²²) are comparable to the ORs obtained in our cohort.

The CCI is a diagnostic-based comorbidity score used to predict mortality in many clinical situations, including bloodstream infection.²⁰ In previous studies of patients with CBI, each point increase in the CCI has been associated with a mortality hazard ratio of 1.15 (95% CI: 1.02-1.29) within 6 weeks of the episode,²⁸ which resembles the OR of 1.27 found in our study. Other previous works have used CCI cut-offs of >6 and ≥ 5 ;^{3,29} we used ≥ 3 , which is reported most frequently in the literature.^{13,20} Our results indicate that this cut-off value is satisfactory, as it provided an adequate c statistic for the model.

The CDS has been used previously as a predictor of infection occurrence,^{15,16} but not for the prediction of outcomes such as infection-related mortality. In our study, the odds of mortality increased 1.21-fold for every point increase in the CDS, as a continuous variable. When the proposed cut-off of CDS ≥ 4 is used, the odds of death increase 2.6-fold. Because of the lack of previous studies testing it, this cut-off value should be considered with caution until further validation.

Although our results support the use of a comorbidity score in combination with the PBS for the prediction of CBI mortality, this study could not establish which comorbidity score should be used, or whether these scores should be used as continuous or dichotomous variables. Our results show little statistical difference among different models including these scores. Thus, the physician's preference and experience with any score,

TABLE 3 Main characteristics of cases according to categorised Pitt Bacteremia Score, Charlson Comorbidity Index and Chronic Disease Score

	Pitt Bacteremia Score			Charlson Comorbidity Index			Chronic Disease Score		
	≤1 (n=110)	≥2 (n=79)	P	≤2 (n=87)	≥3 (n=102)	P	≤3 (n=68)	≥4 (n=121)	P
Age, y	67.5 (15.5)	70.3 (17.2)	.246	67.1 (19.1)	69.9 (13.3)	.241	64.2 (19.1)	71.2 (13.8)	.009
Sex: Male	64 (58.7)	48 (60.8)	.770	47 (54.7)	65 (63.7)	.200	40 (58.8)	72 (60.0)	.870
Previous admission (within 30 d)	23 (20.9)	16 (20.3)	.910	15 (17.2)	24 (23.5)	.290	12 (17.6)	27 (22.3)	.450
Origin of infection: Hospital acquired	83 (75.5)	66 (83.5)	.180	64 (73.6)	85 (83.3)	.100	53 (77.9)	96 (79.3)	.820
Solid neoplasm	53 (48.2)	35 (44.3)	.598	21 (24.1)	67 (65.7)	<.001	27 (39.7)	61 (50.4)	.157
Chronic heart disease	51 (46.4)	31 (39.2)	.330	28 (32.2)	54 (52.9)	.004	0 (0.0)	82 (67.8)	<.001
Diabetes	30 (27.3)	21 (26.6)	.920	13 (14.9)	38 (37.3)	.001	6 (8.8)	45 (37.2)	<.001
Haematologic neoplasm	24 (21.8)	10 (12.7)	.106	16 (18.4)	18 (17.6)	.894	10 (14.7)	24 (19.8)	.378
Bone marrow transplantation	14 (12.7)	4 (5.1)	.085	7 (8.0)	11 (10.8)	.523	5 (7.4)	13 (10.7)	.446
Chronic lung disease	10 (9.1)	7 (8.9)	.957	8 (9.2)	9 (8.8)	.929	3 (4.4)	14 (11.6)	.990
Chronic liver disease	7 (6.4)	8 (10.1)	.340	1 (1.1)	14 (13.7)	.001	9 (13.2)	6 (5.0)	.043
Chronic kidney disease	6 (5.5)	7 (8.9)	.361	0 (0)	13 (12.7)	<.001	2 (2.9)	11 (9.1)	.140
HIV infection	1 (0.9)	2 (2.5)	.572	0 (0)	3 (2.9)	.251	3 (4.4)	0 (0.0)	.045
Solid organ transplantation	1 (0.9)	1 (1.3)	>.999	0 (0)	2 (2.0)	.501	0 (0.0)	2 (1.7)	.537
Neutropenia	11 (10.0)	8 (10.1)	.977	7 (8.0)	12 (11.8)	.397	6 (8.8)	13 (10.7)	.674
CCI score	3.3 (2.3)	3.3 (2.6)	.850	-	-	-	2.6 (2.6)	3.7 (2.3)	.002
CCI≥3	60 (54.5)	42 (53.2)	.851	-	-	-	25 (36.8)	77 (63.3)	<.001
CDS	5.1 (3.0)	4.6 (3.7)	.260	3.7 (2.9)	5.9 (3.3)	<.001	-	-	-
CDS≥4	78 (70.9)	43 (54.4)	.020	44 (50.6)	77 (75.5)	<.001	-	-	-
Presence of CVC	71 (64.5)	51 (64.6)	.999	56 (64.4)	66 (64.7)	.961	44 (64.7)	78 (64.5)	.973
Parenteral nutrition	65 (59.1)	49 (62.0)	.684	51 (58.6)	63 (61.8)	.660	41 (60.3)	73 (60.3)	.996
Previous invasive procedure	54 (49.1)	57 (72.2)	.001	49 (56.3)	62 (60.8)	.535	44 (64.7)	67 (55.4)	.211
Previous urinary catheter	40 (36.4)	50 (63.3)	<.001	48 (55.2)	42 (41.2)	.055	35 (51.5)	55 (45.5)	.427
Previous blood components transfusion	39 (35.5)	41 (51.9)	.024	26 (29.9)	54 (52.9)	.001	25 (36.8)	55 (45.5)	.264
Previous surgery	33 (30.0)	31 (39.2)	.185	25 (28.7)	39 (38.2)	.169	26 (38.2)	38 (31.4)	.341
Chemotherapy	28 (25.5)	12 (15.2)	.088	12 (13.8)	28 (27.5)	.022	7 (10.3)	10 (27.3)	.006
Receipt of corticosteroids	18 (16.4)	7 (8.9)	.133	7 (8.0)	18 (17.6)	.052	5 (7.4)	20 (16.5)	.074
Previous ICU stay	12 (10.9)	23 (29.1)	.001	21 (24.1)	14 (13.7)	.066	16 (23.5)	19 (15.7)	.184
Previous mechanical ventilation	8 (7.3)	20 (25.3)	.001	16 (18.4)	12 (11.8)	.201	13 (19.1)	15 (12.4)	.212
Unknown focus	44 (40.0)	27 (34.2)	.415	26 (29.9)	45 (44.1)	.044	21 (30.9)	50 (41.3)	.155
Associated bacterial infection	59 (53.6)	55 (69.6)	.027	53 (60.9)	61 (59.8)	.876	36 (52.9)	78 (64.5)	.120
CBI-related shock	0 (0.0)	36 (45.6)	<.001	17 (19.5)	19 (18.6)	.873	16 (23.5)	20 (16.5)	.239
CBI-related DIC	0 (0.0)	5 (6.3)	.012	4 (4.6)	1 (1.0)	.182	3 (4.4)	2 (1.7)	.352
CBI-related ARDS	0 (0.0)	17 (21.5)	<.001	8 (9.2)	9 (8.8)	.929	8 (11.8)	9 (7.4)	.318
Embolic phenomena	8 (7.3)	7 (8.9)	.690	8 (9.2)	7 (6.9)	.554	6 (8.8)	9 (7.4)	.735
PBS	-	-	-	2.4 (2.5)	2.0 (2.2)	.330	2.6 (2.6)	2.0 (2.2)	.127
PBS: ≥2 points	-	-	-	37 (42.5)	42 (41.2)	.851	36 (52.9)	43 (35.5)	.020
Leucocytes related to CBI (×10 ³ /μL)	11.1 (8.6)	8.0 (6.1)	.006	10.4 (7.0)	10.4 (7.7)	.056	10.1 (8.1)	8.9 (6.9)	.269
Granulocytes related to CBI (×10 ³ /μL)	6.5 (5.6)	9.4 (7.6)	.005	8.7 (6.8)	6.8 (6.4)	.055	8.2 (7.1)	7.4 (6.3)	.427
CRP related to CBI, mg/dL	9.8 (8.4)	13.9 (11.0)	.008	12.5 (10.5)	10.9 (9.1)	.292	10.9 (9.0)	12.0 (10.2)	.479

(Continues)

TABLE 3 (Continued)

	Pitt Bacteremia Score			Charlson Comorbidity Index			Chronic Disease Score		
	≤1 (n=110)	≥2 (n=79)	P	≤2 (n=87)	≥3 (n=102)	P	≤3 (n=68)	≥4 (n=121)	P
Creatinine related to CBI, mg/dL	0.79 (0.45)	1.34 (0.93)	<.001	1.01 (0.75)	1.03 (0.74)	.859	0.99 (0.75)	1.04 (0.74)	.717
<i>Candida parapsilosis</i> infection	49 (44.5)	27 (34.2)	.152	29 (33.3)	47 (46.1)	.075	31 (45.6)	45 (37.2)	.258
Positive blood culture during follow-up	33 (30.0)	29 (36.7)	.333	29 (33.3)	33 (32.4)	.886	25 (36.8)	37 (30.6)	.385
Appropriate empirical treatment	19 (17.3)	25 (31.6)	.021	21 (24.1)	23 (22.5)	.797	15 (22.1)	29 (24.0)	.766
Persistent candidaemia	25 (22.9)	17 (22.4)	.928	21 (24.1)	21 (21.4)	.660	18 (27.3)	24 (20.2)	.269
ICU admission after CBI	6 (5.5)	18 (26.5)	<.001	13 (15.9)	11 (11.5)	.392	9 (14.3)	15 (13.0)	.817
Mechanical ventilation after CBI	6 (5.5)	16 (23.2)	<.001	11 (13.4)	11 (11.3)	.674	7 (11.1)	15 (12.9)	.723
30-d Mortality	20 (18.2)	40 (56.6)	<.001	19 (21.8)	41 (40.2)	.007	15 (22.1)	45 (37.2)	.032

Data are expressed as n (%) for categorical variable and mean (SD) for continuous variables.

Abbreviations: CBI, *Candida* bloodstream infection; HIV, human immunodeficiency virus; CCI, Charlson Comorbidity Index; CDS, Chronic Disease Score; CVC, Central vascular catheter; ICU, intensive care unit; DIC, disseminated intravascular coagulation; ARDS, acute respiratory distress syndrome; PBS, Pitt Bacteremia Score; CRP, C-reactive protein.

TABLE 4 Performance of the Pitt Bacteremia Score, Charlson Comorbidity Index and Chronic Disease Score in predicting 30-d mortality in *Candida* bloodstream infection

	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
Variables ^a				
Age, y	1.042 (1.013-1.071); 0.002	1.030 (1.004-1.058); 0.024	-	1.030 (1.001-1.061); 0.043
Neutrophils, ×10 ³ /μL	0.918 (0.851-0.990); 0.015	0.922 (0.859-0.988); 0.022	0.929 (0.869-0.993); 0.03	0.929 (0.867-0.996); 0.039
Previous blood components transfusion	2.42 (1.11-5.27); 0.025	2.43 (1.13-5.23); 0.023	3.06 (1.44-6.50); 0.004	2.40 (1.07-5.37); 0.034
Previous urinary catheter	2.73 (1.20-6.19); 0.015	3.00 (1.35-6.65); 0.007	-	-
Pitt Bacteremia Score	1.436 (1.201-1.717); <0.001	-	1.446 (1.210-1.729); 0.001	-
Charlson Comorbidity Index	1.274 (1.088-1.492); 0.002	-	-	-
Pitt Bacteremia Score≥2	-	4.59 (2.16-9.77); <0.0001	-	5.10 (2.22-11.73); <0.001
Charlson Comorbidity Index≥3	-	2.54 (1.16-5.58); 0.02	-	-
Chronic Disease Score	-	-	1.213 (1.079-1.364); 0.001	-
Chronic Disease Score≥4	-	-	-	2.64 (1.12-6.24); 0.027
Creatinine, mg/dL	-	-	2.183 (1.272-3.746); 0.005	2.037 (1.113-3.729); 0.021
Central vascular catheter	-	-	-	3.39 (1.30-8.90); 0.013
Model statistics				
-2 Log (maximum likelihood)	177.8	182.8	177.7	176.5
Akaike Information Criterion	189.8	194.4	187.9	190.5
Hosmer-Lemeshow ^b	0.397	0.283	0.210	0.602
C statistic ^c	0.82 (0.76-0.89)	0.81 (0.75-0.88)	0.78 (0.71-0.85)	0.82 (0.76-0.89)

^aData are expressed as Odds ratio (95% confidence interval); P value.

^bData denotes the P value of the Hosmer-Lemeshow test.

^cData denotes C statistic (95% confidence interval).

the availability of a reliable pharmaceutical database, and the limitations of each index should be considered. The CCI has been used extensively and validated in several studies, but it was developed nearly three decades ago and some conditions included may have no association with mortality

or be inappropriately weighed at present. The CDS was developed more recently, is less well known, less user-friendly for clinicians and does not include renal failure, but the availability of reliable and inexpensive data from pharmaceutical electronic records may favour its use.³⁰ Although the CCI

and CDS have been combined in other settings,³¹ this practice should be discouraged from the clinical and statistical points of view because of the risk of collinearity.⁷ In our study, we lack information regarding APACHE II or SOFA scores, since we selected PBS score as the unique severity index due to its simplicity and clinical applicability and for being more parsimonious than abovementioned scores. In this context, it is of note that a model including only age, CCI and PBS retained an important predictive ability, and its use could be also considered for reasons of simplicity. Another potential limitation of our work is the use of regression techniques, which may be prone to overfitting, instead of a Bayesian approach.

Apart from the PBS, CCI and CDS, other variables were associated significantly with 30-day mortality in our study. Current guidelines consider the withdrawal of a central vascular catheter to be one measure that can reduce mortality in cases of candidaemia.³² Our results also support the notion that a low neutrophil count is not only a factor for the development of CBI, but also a determinant of outcome in affected patients.³³ The creatinine concentration is a well-described factor related to poor prognosis, especially in critically ill patients³¹; as the CDS does not include any pharmaceutical prescription related to renal failure, the creatinine concentration should be used for adjustment in models including the CDS. The presence of a urinary catheter has been mentioned previously as a predisposing factor for CBI development and as an independent predictor of 30-day mortality.³⁴ Finally, although transfusion of blood components has been linked to the development of CBI,³⁵ it has not, to the best of our knowledge, been previously reported as a risk factor for mortality in patients with CBI. Further prospective studies should be conducted to confirm this finding.

5 | CONCLUSIONS

Our study findings support the combined use of a severity index (PBS) and a comorbidity index (CCI or CDS) in predicting mortality in patients with CBI. This approach may help to predict mortality in the clinical setting and facilitate the analysis of risk factors for mortality by summarising a large number of variables in a single measure.

CONFLICTS OF INTEREST

All authors: No reported conflicts.

REFERENCES

- Berdal JE, Haagensen R, Ranheim T, Bjornholt JV. Nosocomial candidemia; risk factors and prognosis revisited; 11 years experience from a norwegian secondary hospital. *PLoS ONE*. 2014;9:e103916.
- Colombo AL, Guimaraes T, Sukienik T, et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive Care Med*. 2014;40:1489-1498.
- Fortun J, Martin-Davila P, Gomez-Garcia de la Pedrosa E, et al. Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. *J Infect*. 2012;65:64-70.
- Andes DR, Safdar N, Baddley JW, et al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clin Infect Dis*. 2012;54:1110-1122.
- Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:317-322.
- Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Gottfredsson M. Improving survival of patients with candidaemia: analysis of prognostic factors from a long-term, nationwide study in Iceland. *Scand J Infect Dis*. 2005;37:111-120.
- Babayak MA. What you see may not be what you get: a brief, nontechnical introduction to overfitting in regression-type models. *Psychosom Med*. 2004;66:411-421.
- McGregor JC, Perencevich EN, Furuno JP, et al. Comorbidity risk-adjustment measures were developed and validated for studies of antibiotic-resistant infections. *J Clin Epidemiol*. 2006;59:1266-1273.
- Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40:373-383.
- Von Korff M, Wagner EH, Saunders K. A chronic disease score from automated pharmacy data. *J Clin Epidemiol*. 1992;45:197-203.
- Rhee JY, Kwon KT, Ki HK, et al. Scoring systems for prediction of mortality in patients with intensive care unit-acquired sepsis: a comparison of the Pitt bacteremia score and the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II scoring systems. *Shock*. 2009;31:146-150.
- Charlson M, Sazatornelli TP, Peterson J, Gold J. Validation of a combined comorbidity index. *J Clin Epidemiol*. 1994;47:1245-1251.
- Lesens O, Methlin C, Hansmann Y, et al. Role of comorbidity in mortality related to *Staphylococcus aureus* bacteremia: a prospective study using the Charlson weighted index of comorbidity. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003;24:890-896.
- Clark DO, Von Korff M, Saunders K, Baluch WM, Simon GE. A chronic disease score with empirically derived weights. *Med Care*. 1995;33:783-795.
- McGregor JC, Kim PW, Perencevich EN, et al. Utility of the Chronic Disease Score and Charlson Comorbidity Index as comorbidity measures for use in epidemiologic studies of antibiotic-resistant organisms. *Am J Epidemiol*. 2005;161:483-493.
- Stevens V, Concannon C, van Wijngaarden E, McGregor J. Validation of the chronic disease score-infectious disease (CDS-ID) for the prediction of hospital-associated clostridium difficile infection (CDI) within a retrospective cohort. *BMC Infect Dis*. 2013;13:150.
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al. International prospective study of Klebsiella pneumoniae bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med*. 2004;140:26-32.
- Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med*. 1977;296:1305-1309.
- Clinical Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard. CLSI document M27-A3*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- Lu KJ, Kearney LG, Ord M, Jones E, Burrell LM, Srivastava PM. Age adjusted Charlson Co-morbidity Index is an independent predictor of mortality over long-term follow-up in infective endocarditis. *Int J Cardiol*. 2013;168:5243-5248.
- Giacobbe DR, Esteves P, Bruzzi P, et al. Initial serum (1,3)-beta-D-glucan as a predictor of mortality in proven candidaemia: findings from a retrospective study in two teaching hospitals in Italy and Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:954 e9-954 e17.
- Rodriguez-Hernandez MJ, Ruiz-Perez de Pipaon M, Marquez-Solero M, et al. Candidemias: analisis multicentrico en 16 hospitales andaluzes. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:328-333.

23. Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control*. 1974;716-723.
24. Lemeshow S, Hosmer DW Jr. A review of goodness of fit statistics for use in the development of logistic regression models. *Am J Epidemiol*. 1982;115:92-106.
25. Lim CJ, Cheng AC, Kong DC, Peleg AY. Community-onset bloodstream infection with multidrug-resistant organisms: a matched case-control study. *BMC Infect Dis*. 2014;14:126.
26. Rodriguez-Bano J, Picon E, Gijon P, et al. Risk factors and prognosis of nosocomial bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1726-1731.
27. Kim J, Joo EJ, Ha YE, et al. Impact of a computerized alert system for bacteremia notification on the appropriate antibiotic treatment of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32:937-945.
28. Kim SH, Yoon YK, Kim MJ, Sohn JW. Clinical impact of time to positivity for *Candida* species on mortality in patients with candidaemia. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:2890-2897.
29. Tang HJ, Liu WL, Lin HL, Lai CC. Clinical manifestations and prognostic factors of central line-associated candidemia. *Am J Infect Control*. 2014;42:1238-1240.
30. Parker JP, McCombs JS, Graddy EA. Can pharmacy data improve prediction of hospital outcomes? Comparisons with a diagnosis-based comorbidity measure. *Med Care*. 2003;41:407-419.
31. Mehta HB, Mehta V, Tsai CL, Chen H, Aparasu RR, Johnson ML. Development and validation of the RxDx-dementia risk index to predict dementia in patients with type 2 diabetes and hypertension. *J Alzheimers Dis*. 2015;49:423-432.
32. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48:503-535.
33. Yang ZT, Wu L, Liu XY, et al. Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial *Candida* spp. bloodstream infection in Shanghai. *BMC Infect Dis*. 2014;14:241.
34. Chen LY, Liao SY, Kuo SC, et al. Changes in the incidence of candidemia during 2000-2008 in a tertiary medical centre in northern Taiwan. *J Hosp Infect*. 2011;78:50-53.
35. Han SS, Yim JJ, Yoo CG, et al. Clinical characteristics and risk factors for nosocomial candidemia in medical intensive care units: experience in a single hospital in Korea for 6.6 years. *J Korean Med Sci*. 2010;25:671-676.

How to cite this article: Vaquero-Herrero MP, Ragozzino S, Castaño-Romero F, et al. The Pitt Bacteremia Score, Charlson Comorbidity Index and Chronic Disease Score are useful tools for the prediction of mortality in patients with *Candida* bloodstream infection. *Mycoses*. 2017;00:1-10. <https://doi.org/10.1111/myc.12644>