

Epidemiología de Candidemias y Utilidad de Métodos Rápidos de Diagnóstico

T e s i s D o c t o r a l 2 0 1 2

Autor:

Julio García Rodríguez

Directores:

Rafael Herruzo Cabrera

Jesús Mingorance Cruz



Epidemiología de Candidemias y Utilidad de Métodos Rápidos de Diagnóstico

T e s i s D o c t o r a l 2 0 1 2

Autor:

Julio García Rodríguez

Directores:

Rafael Herruzo Cabrera

Jesús Mingorance Cruz



DON RAFAEL HERRUZO CABRERA y DON JESÚS MINGORANCE CRUZ

CERTIFICAN:

Que D. JULIO GARCÍA RODRÍGUEZ ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Epidemiología de Candidemias y Utilidad de Métodos Rápidos de Diagnóstico” con el objetivo de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste a todos los efectos, firmamos el presente certificado en Madrid, a 1 de octubre de 2012.

Fdo: Rafael Herruzo Cabrera

Fdo: Jesús Mingorance Cruz

AGRADECIMIENTOS

A Avelino Gutiérrez por su confianza y apoyo incondicional.

A Rafael Herruzo y Jesús Mingorance por su estímulo e inapreciables consejos en la elaboración de este trabajo.

A Inmaculada Quiles porque sin ella, parte de este estudio no se podría haber llevado a cabo.

A Teun Boekhout del CBS por su amabilidad y permitirme participar en un proyecto tan interesante.

Al laboratorio de micología del Centro Nacional de Microbiología y en especial a Manuel Cuenca, Alicia Gómez y Emilio Cendejas porque de una u otra forma han ayudado y apoyado.

A Manuela de Pablos porque es la que está cuando yo no puedo estar.

Al resto de mis compañeros, incluidos los jubilados y residentes, porque me aguantan todos los días.

A Mercedes, Rocío y Patricia. Parte imprescindible en algunos o en la mayor parte de los estudios que completan este proyecto.

A Elena Esteban porque ella ha materializado de forma profesional y elegante lo que yo quería contar.

A mi familia por su amor y apoyo, especialmente a mis padres, porque ellos son realmente los autores de todo esto.

A María José, porque me quiere y confía en mí más que yo.



*“La ilusión despierta el empeño y solamente
la paciencia lo termina”*

Anónimo

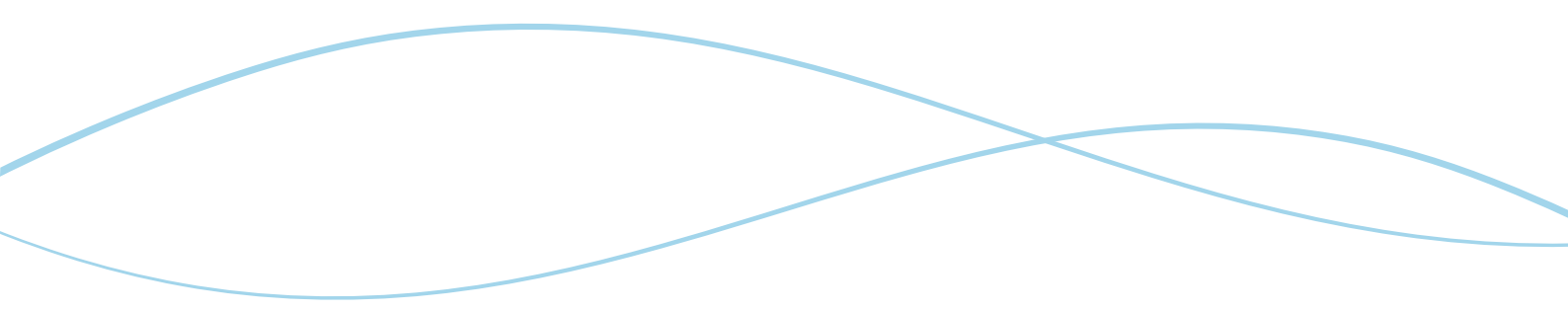


ÍNDICE

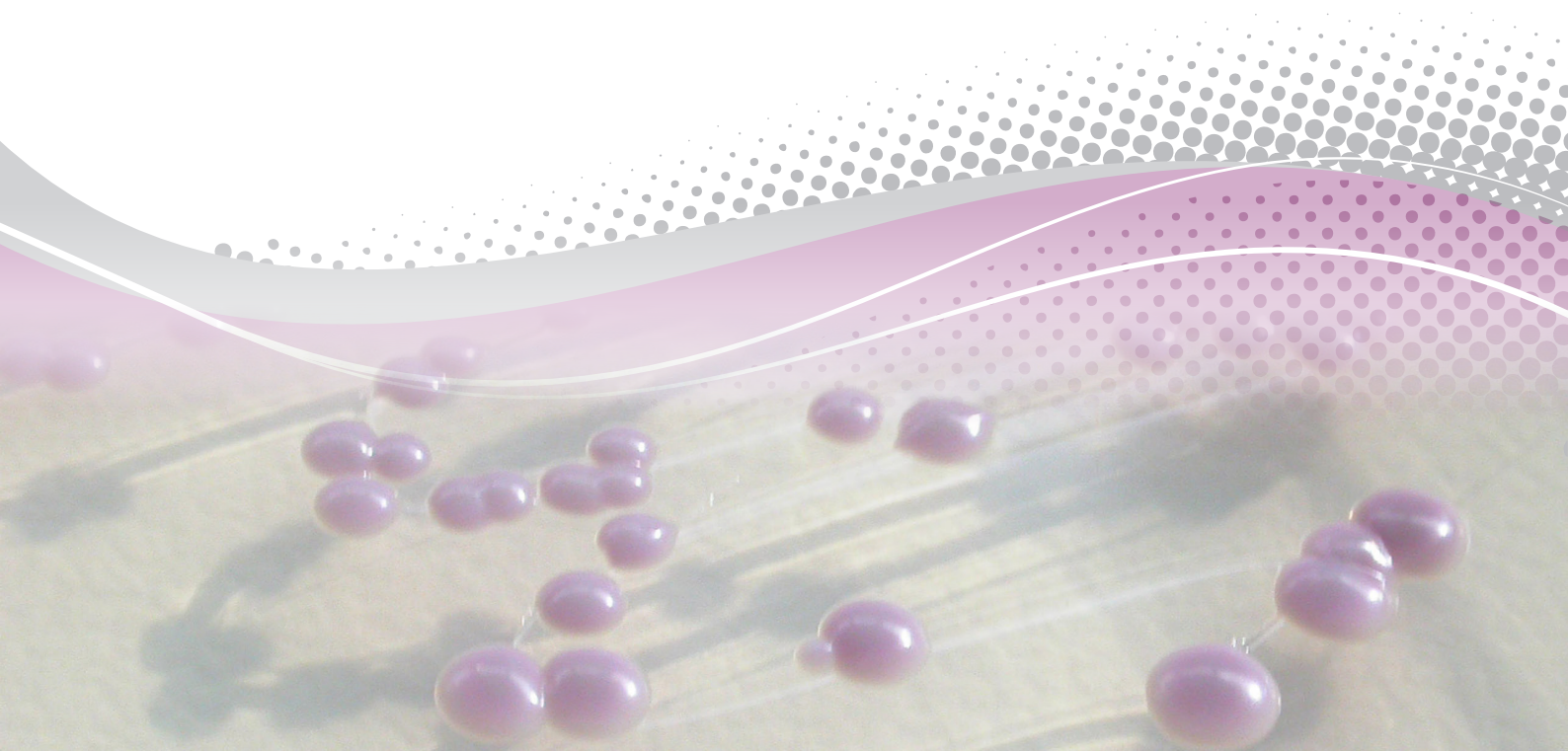
	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.	15
1a. Género <i>Candida</i> .	15
1a1. <i>Candida albicans</i> .	16
1a2. <i>Candida parapsilosis</i> .	18
1a3. <i>Candida glabrata</i> .	19
1a4. <i>Candida tropicalis</i> .	20
1a5. <i>Candida krusei</i> .	21
1a6. Consideraciones clínicas y terapéuticas.	22
1b. Candidemia. Epidemiología mundial y local.	23
1c. Importancia de un diagnóstico correcto y un tratamiento adecuado precoz en el pronóstico de candidemia.	25
1d. Pirosecuenciación en la identificación microbiana.	26
1e. Espectrometría de masas en la identificación microbiana.	29
2. OBJETIVOS.	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	41
3a. Estudio epidemiológico:	41
3a1. Estudio FUNGEMYCA.	41
3a2. Estudio CANDIPOP.	42
3a3. Estudio epidemiológico de candidemias en el Hospital Universitario La Paz.	42
3b. Identificación rápida de levaduras en hemocultivo mediante pirosecuenciación.	43
3c. Identificación rápida de levaduras mediante el sistema MALDI-TOF.	44
3c1. Identificación de las especies del complejo <i>C. parapsilosis</i> .	45
3c2. Estudio MALDI-YEAST RING.	46
4. RESULTADOS.	51
4a. Estudio epidemiológico:	51
4a1. Estudio FUNGEMYCA.	51
4a2. Estudio CANDIPOP.	52
4a3. Estudio epidemiológico en el Hospital Universitario La Paz.	53
4b. Identificación rápida de levaduras en hemocultivo mediante pirosecuenciación.	55
4c. Identificación rápida de levaduras mediante el sistema MALDI-TOF.	57
4c1. Identificación de levaduras del complejo <i>C. parapsilosis</i> mediante MALDI-TOF	57
4c2. Estudio MALDI-YEAST RING.	59

ÍNDICE

	Pág.
5. DISCUSIÓN.	65
5a. Estudios epidemiológicos.	65
5b. Métodos diagnósticos.	69
6. CONCLUSIONES.	75
7. ABREVIATURAS.	79
8. BIBLIOGRAFÍA.	83
9. APÉNDICE.	97



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

La infección fúngica invasora (IFI) es una patología cada vez más prevalente dado que la población susceptible va incrementándose con un mayor número de factores predisponentes en buena medida como consecuencia de los avances médicos. Actualmente se pueden identificar claramente aquellos grupos que tienen un mayor riesgo de padecer IFI: pacientes neutropénicos con leucemia mieloide aguda, síndromes mielodisplásicos o trasplantes alogénicos de médula ósea, trasplantados de órgano sólido, oncológicos, con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, ingresados en unidades de críticos, tratamientos prolongados con esteroides, neonatos pretérmino... La lista es cada vez mayor. Como algunos autores han señalado (1), la patología fúngica presenta actualmente tres importantes características: incremento de aspergilosis invasora hasta representar la IFI más frecuente en pacientes hematológicos; infecciones fúngicas por hongos emergentes y finalmente infecciones profundas por levaduras del género *Candida* en pacientes críticos no neutropénicos.

1a. GÉNERO *Candida*.

Las levaduras son un grupo de hongos unicelulares, generalmente ovoides, redondeados, o irregulares, que se reproducen por gemación en células hijas llamadas blastoconidias. Estas, algunas veces no se separan y siguen elongándose produciendo pseudohifas y pseudomicelio. Algunas especies en raras ocasiones, especialmente con ambientes microaerófilos, pueden formar hifas verdaderas y auténtico micelio. Macroscópicamente forman colonias de aspecto húmedo, cremoso o más secas, en general sin micelio aparente y con distintas pigmentaciones que van desde el blanco al marrón oscuro o negro (2). En conjunto, no constituyen un grupo taxonómico definido ya que esta agrupación se basa en criterios puramente morfológicos. De entre todas las levaduras, el género *Candida* constituye el grupo clínicamente más importante.

Desde el punto de vista taxonómico, *Candida* sp. pertenece al *phylum* *Ascomycota*, *subphylum* *Saccharomycotina*, *clase* *Saccharomycetes*, *orden* *Saccharomycetidae* y *familia* *Saccharomycetales* (3). Hasta el momento se han descrito más de 200 especies de las cuales solo una veintena producen patología en el

INTRODUCCIÓN

ser humano (4). Sin embargo, la reclasificación y descripción de nuevas especies aisladas en muestras clínicas es constante. Esto es debido fundamentalmente a que el género está constituido por un conjunto muy heterogéneo de especímenes que clásicamente encajaban en la descripción de: cualquier levadura en forma asexual que no produce ácido acético, no tiene un pigmento rojo, rosa o naranja macroscópicamente detectable, no presenta artroconidias, no tiene gemaciones uni o bipolares de base ancha ni gemas en tallos, no tiene blastoconidias simpodiales, no tiene conidias terminales en forma de aguja, células triangulares ni gemaciones enteroblásticas basípetas, forma habitualmente colonias mucosas, puede crecer utilizando inositol como única fuente de carbono y no forma ballistoconidias (2).

Actualmente, las nuevas técnicas de biología molecular y secuenciación de regiones conservadas o variables del genoma fúngico permiten una definición positiva, basada en la presencia de determinadas secuencias, y están reasignando y describiendo nuevas especies muy cercanas genéticamente y difíciles de diferenciar fenotípicamente (4-6). Estas especies crípticas adquieren un notable interés clínico porque muchas veces su patrón de sensibilidad frente a antifúngicos es variado y poco predecible.

Aunque constantemente se estén describiendo nuevas especies patógenas, las especies de *Candida* más frecuentemente implicadas en patología humana son: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y en menor medida *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida famata*, *Candida lipolytica*, *Candida dubliniensis*, *Candida norvegensis* o *Candida rugosa*.

1a1. *Candida albicans*.

C. albicans es el hongo más relacionado con patología humana (7) (Figura 1). Es una levadura ovalada o subesférica de 3-8 x 2-7 μm que forma pseudohifas y en ocasiones hifas verdaderas. Típicamente presenta clamidosporas únicas características que se disponen terminales en la hifa. Cuando las levaduras se incuban en suero humano durante 2-3 horas a 37°C, forman unos tubos elongados sin constricciones en la base denominados tubos germinales (Figura 2). Las colonias tienen color crema, de consistencia húmeda y en medios ricos como agar sangre, pueden crecer produciendo unas extensiones o “pies” en el borde de la colonia (8). Se desconoce hasta la fecha su teleomorfo. Habitualmente se encuentra como comensal,

INTRODUCCIÓN

colonizando las mucosas y tracto gastrointestinal de humanos y una gran cantidad de mamíferos (9). La mayoría de los aislados de *C. albicans* permanecen muy sensibles a la mayor parte de los antifúngicos sistémicos utilizados en la clínica.

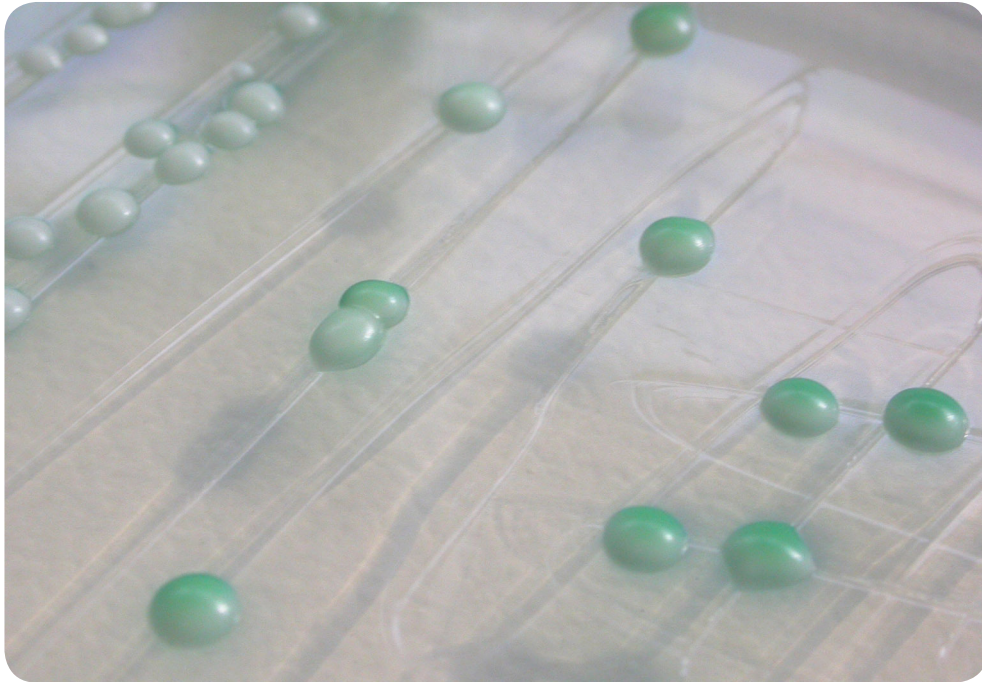


Figura 1. Colonias verdes características de *C. albicans* en medio de CHROMagar.

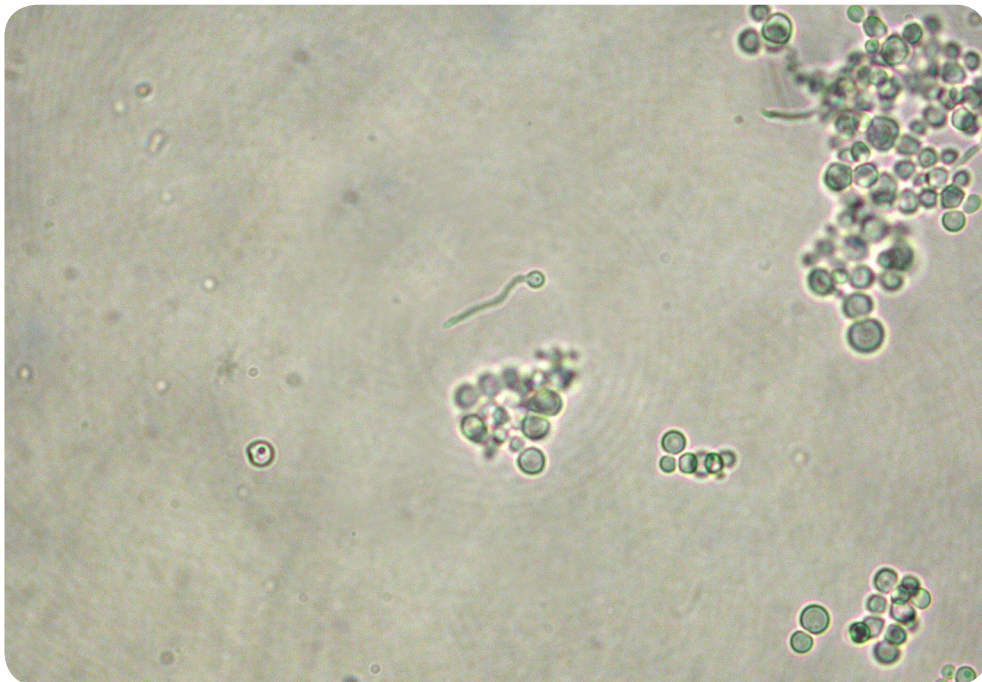


Figura 2. Tubos germinales.

INTRODUCCIÓN

1a2. *Candida parapsilosis*.

C. parapsilosis se describió originalmente en Puerto Rico, aislada en las heces de un paciente con diarrea. La levadura es ovoidal, de 2,5-4 x 3-8 μm . A veces forma pseudohifas, pero a diferencia de *C. albicans*, nunca forma hifas verdaderas. Macroscópicamente crece formando colonias de color más o menos blanco o crema que pueden ser lisas o muy plegadas. Este cambio morfológico, parece estar mediado por un conjunto de aminoácidos del medio ambiente que podrían actuar a través de receptores específicos de la membrana celular, desencadenando una señal que determinaría la diferenciación celular, traduciéndose en un aspecto más o menos liso o rugoso de la colonia (10) (Figura 3). Su reservorio, como *C. albicans*, se encuentra en una gran cantidad de mamíferos pero también puede localizarse en superficies, suelo, agua dulce y salada e insectos (8,11). Algunos autores han propuesto a *Lodderomyces elongisporus* como el teleomorfo de *C. parapsilosis*, sin embargo estudios modernos parecen descartarlo y señalan a *L. elongisporus* como un taxón claramente diferenciado de *C. parapsilosis* aunque muy relacionado genéticamente (11). Recientemente, Tavanti *et al.* (5), han propuesto dos nuevas especies muy cercanas a *C. parapsilosis* que reemplazarían a los clásicos grupos I, II y III en los que se dividía esta especie, de tal forma que el grupo I correspondería con *C. parapsilosis sensu stricto*, el grupo II con *Candida orthopsilosis* y el grupo III con *Candida metapsilosis*. Estas nuevas especies parecen tener diferencias con *C. parapsilosis* en cuanto a la sensibilidad a los antifúngicos con CMI más bajas frente a equinocandinas (12). A pesar de todo, las especies del complejo *C. parapsilosis* suelen ser sensibles a la mayor parte de los antifúngicos sistémicos, aunque con una sensibilidad menor a todas las equinocandinas que se expresa con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) más elevadas.

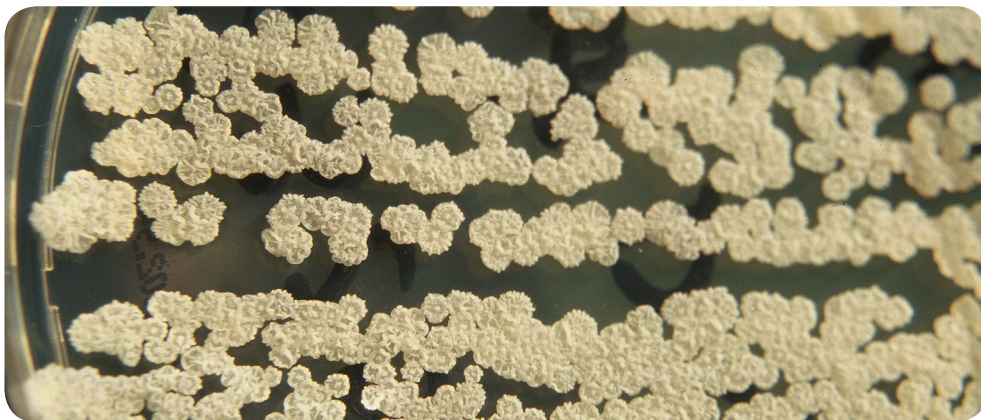


Figura 3. Colonias rugosas de *C. parapsilosis* creciendo en medio de Sabouraud-Glucosa.

INTRODUCCIÓN

1a3. *Candida glabrata*.

C. glabrata es una especie históricamente considerada como un saprofito de la flora normal de individuos sanos. Sin embargo su importancia como patógeno ha ido creciendo hasta convertirse en la segunda o tercera especie más relacionada con patología humana. Originalmente se describió como parte del género *Torulopsis* por su falta de producción de pseudohifas, pero en 1974 se estableció que este criterio no era fiable para la definición de género y se propuso la incorporación de *Torulopsis glabrata* al género *Candida* (13). Crece formando pequeñas colonias lisas, pastosas, blancas o color crema (Figura 4). Característicamente presenta unas blastoconidias más pequeñas que las de *C. albicans* (2-3 x 3-4µm) sin pseudohifas y con pequeñas gemaciones (8). Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza colonizando animales y seres humanos; y aunque se ha aislado de superficies inertes en ambientes hospitalarios, se cree que esta es secundaria a una contaminación procedente de portadores sanos (13). Aparentemente carece de ciclo sexual (14) y en contraste con la mayor parte de las especies patógenas que son diploides, *C. glabrata* es un organismo haploide con 13 cromosomas y estrechamente relacionada genéticamente con *Saccharomyces cerevisiae* (15). Recientemente se han descrito dos nuevas especies crípticas muy cercanas genéticamente a *C. glabrata* y difíciles de diferenciar fenotípicamente, *Candida nivariensis* y *Candida bracarensis*. Lo que la convierte en un complejo de especies (16-18). Su aislamiento en muestras clínicas tiene una gran trascendencia por su facilidad para desarrollar resistencia a azoles, incluso durante los tratamientos.

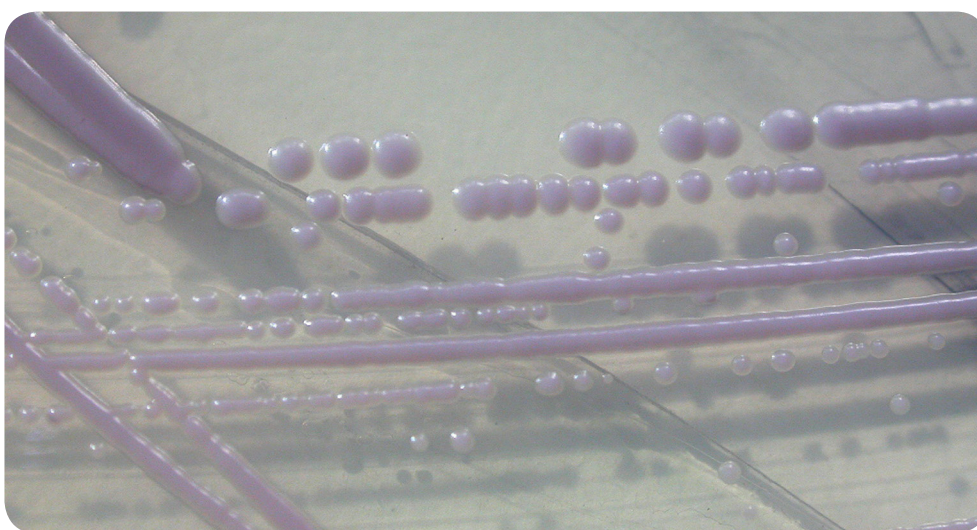


Figura 4. Colonias cremosas de *C. glabrata* en medio de CHROMagar con su color característico.

INTRODUCCIÓN

1a4. *Candida tropicalis*.

C. tropicalis es junto a *C. albicans* una especie muy relacionada con infección (Figura 5). Es especialmente virulenta en pacientes con leucemia u otras neoplasias, aunque también aparece como comensal en población sana. Es una levadura oval o redondeada de 3,5-7 x 5,5-10 μm de tamaño. En ocasiones forma clamidosporas y raramente un micelio verdadero con hifas, por eso se considera dimórfica. Las colonias son indistinguibles del resto de las especies, con color crema (8). Como la mayor parte de ellas, se ha encontrado en un amplio rango de animales, tanto mamíferos como aves o anfibios. Se ha aislado en fómites, suelo y alimentos, lo que la hace ser muy ubicua (9). Aunque se ha detectado en todo el mundo como productora de patología, se la describe con mayor incidencia en países de la región ecuatorial de Asia y Brasil (19), por lo que muchos autores postulan que las condiciones de humedad y temperatura de estas áreas podrían favorecer una mayor adaptabilidad de la levadura al medio y por tanto altos niveles de exposición ambiental en población susceptible (20). En cuanto al tratamiento, al igual que con *C. albicans*, la mayoría de los aislamientos se mantienen sensibles a la mayor parte de los antifúngicos pero en los últimos años se ha observado un aumento de CMI al fluconazol (19,20).

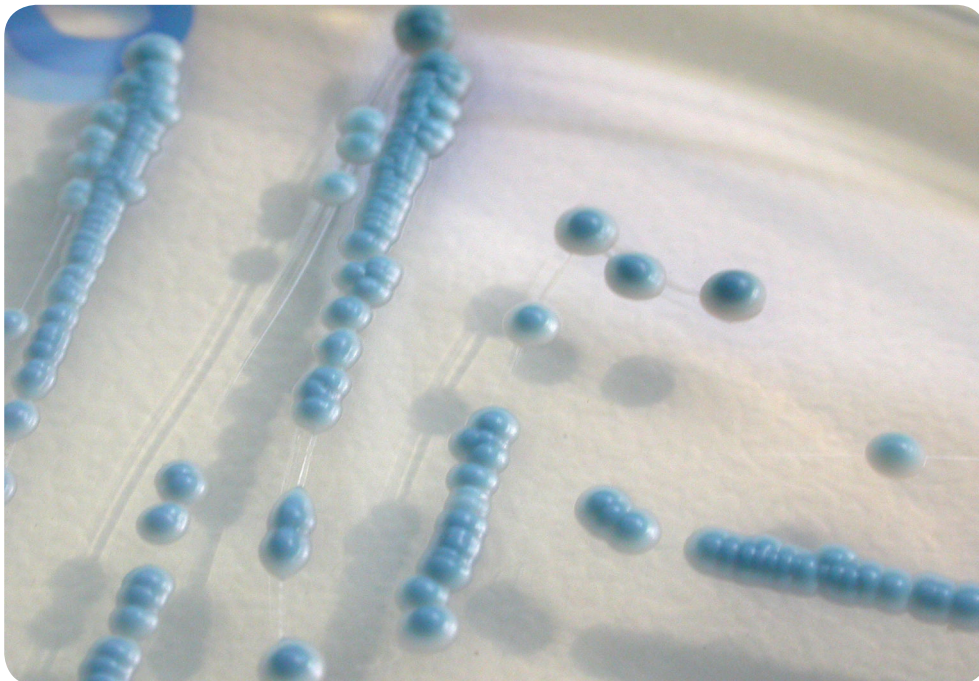


Figura 5. Colonias típicas azules de *C. tropicalis* en medio de CHROMagar.

INTRODUCCIÓN

1a5. *Candida krusei*.

C. krusei es una especie que ha ido adquiriendo progresivamente importancia como patógeno oportunista. Se le considera patógeno emergente, ya que aunque es menos virulenta que *C. albicans* y *C. tropicalis*, afecta especialmente a pacientes oncohematológicos granulocitopénicos, especialmente si están sometidos a profilaxis con fluconazol, ya que es intrínsecamente resistente al mismo (21). Esta especie tiene un crecimiento peculiar en los medios habituales, ya que sus colonias son planas y aterciopeladas o secas, con un pequeño micelio. Microscópicamente, presenta unas levaduras ovoides o muy elongadas de 2-6 μm x 4-10 μm (Figura 6), que forman abundantes pseudohifas y todo ello da una apariencia arbórea ramificada. Estas formaciones se pueden confundir con los anélices de *Saprochaete capitata* con el que hay que hacer un diagnóstico diferencial (8). La ecología de *C. krusei* es similar a las otras especies ya que se la ha encontrado en mamíferos, algunas aves, suelo, superficie de frutas y alimentos en general y en fómites (9).

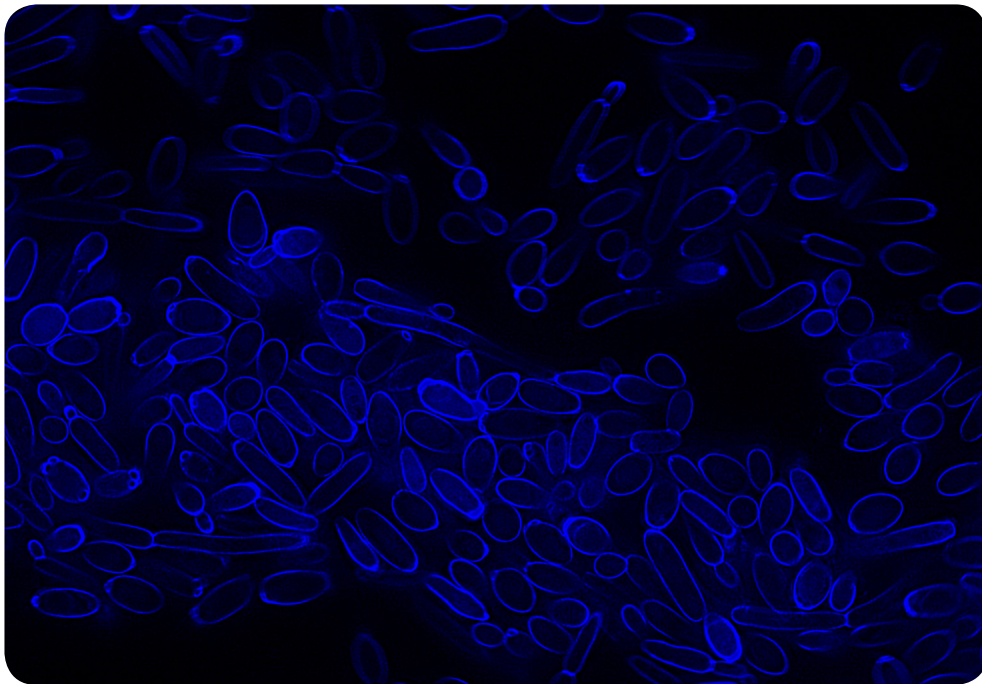


Figura 6. Levaduras de *C. krusei*. Tinción fluorescente Blanco de calcoflúor con un filtro azul. Microscopio de deconvolución. 400x.

INTRODUCCIÓN

1a6. CONSIDERACIONES CLÍNICAS Y TERAPÉUTICAS.

La mayor parte de las especies de *Candida* presentan diversos mecanismos de virulencia que les permiten colonizar e invadir casi todos los ambientes orgánicos. Por tanto el espectro de patología que causan en el ser humano es muy amplio y clásicamente se clasifica en:

- Enfermedades alérgicas ocasionadas por *Candida*. Aunque poco frecuentes, los metabolitos de *Candida* pueden provocar procesos alérgicos conocidos como candidides.
- Candidiasis superficiales. Aquellas infecciones que afectan a la piel y las mucosas. Abarca un gran abanico de enfermedades que van desde la onicomicosis (especialmente *C. albicans* y *C. parapsilosis*) a infecciones de piel como intertrigos candidiásicos, lesiones cutáneas secundarias a diseminación profunda, infecciones de ojos y oídos, mucosa orofaríngea y esofágica, área urogenital con vaginitis, balanitis o balanopositis candidiásica y cistitis. Finalmente, se incluiría aquí un cuadro más grave, la candidiasis mucocutánea crónica, que es una enfermedad poco frecuente consistente en infecciones pertinaces en boca, piel y uñas por *C. albicans* que suelen ser resistentes a los tratamientos convencionales y con frecuencia se asocia a inmunodeficiencias primarias (9,22).
- Candidiasis profundas. Los factores de riesgo para padecer una candidiasis profunda o invasora han ido migrando desde los clásicos pacientes hematológicos inmunodeprimidos a pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos (UCI), pacientes con catéteres u otros mecanismos intravasculares, tratamientos con antibióticos de amplio espectro, cirugías previas, nutrición parenteral, hemodiálisis o con largas estancias hospitalarias (1). La levadura puede afectar a cualquier órgano y por tanto engloba un gran número de procesos patológicos: en el sistema nervioso central con meningitis, endoftalmitis o abscesos; en huesos y articulaciones con artritis, osteomielitis y espondilodiscitis; en aparato digestivo y abdomen con esofagitis, peritonitis, infecciones localizadas con abscesos abdominales, candidiasis viscerales; sistema respiratorio con neumonías (raras y en general secundarias a aspiración o embolígenas) y derrames pleurales; infecciones cutáneas profundas en forma de abscesos, miositis, etc; aparato génito-urinario con pielonefritis, abscesos perirrenales, bolas fúngicas, enfermedad inflamatoria pélvica, prostatitis y epididimitis; dado que muchas de ellas producen gran cantidad de biopelícula, pueden colonizar cualquier prótesis o aparato; y por último,

INTRODUCCIÓN

infecciones cardiovasculares con candidemias ya sean primarias o secundarias a otros focos, endocarditis, pericarditis, miocarditis y tromboflebitis supurada (9,23).

Finalmente, desde el punto de vista terapéutico, tal y como se ha comentado previamente, la mayor parte de las especies más comúnmente aisladas en muestras clínicas todavía permanecen sensibles a fluconazol. Sin embargo, se está produciendo un cambio epidemiológico hacia especies con sensibilidad menos predecible a los antifúngicos. Tabla 1.

Especie	Fz	Iz	Vo	Po	5-Fl	AB	Eq
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S	S-R
<i>C. glabrata</i>	S-DD-R	S-DD-R	S-DD-R	S-DD-R	S	S-I	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. krusei</i>	R	S-DD-R	S	S	I-R	S-I	S

Fz: fluconazol; Iz: itraconazol; Vo: voriconazol; Po: posaconazol; 5-Fl: 5-fluorocitosina; AB: anfotericina b; Eq: equinocandinas. S: sensible. DD:dosis dependiente. I: intermedio. R: resistente. Modificado de Pappas et al. 2009 (23).

Tabla 1. Sensibilidad de las especies de *Candida* más comunes en clínica.

1b. CANDIDEMIA. EPIDEMIOLOGÍA MUNDIAL Y LOCAL.

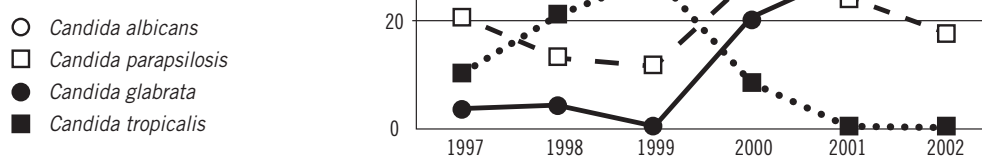
Candidemia es la infección fúngica más común y su incidencia se ha incrementado notablemente desde los años 80 hasta representar el cuarto patógeno más frecuente en septicemias llegando a suponer hasta el 18% de las causas de sepsis nosocomial en los Estados Unidos (24) con una incidencia de 4,6 casos por 10.000 ingresos en EE.UU. o 5,3 casos por 10.000 altas hospitalarias en Europa (1). La mortalidad asociada permanece en torno al 40%. En conjunto, *Candida* spp. constituye el 73% de las causas de infección fúngica invasora en población de riesgo según el “*Prospective Antifungal Therapy Alliance*” elaborado entre 11 centros hospitalarios de Estados Unidos. La especie predominante de este registro que recoge datos de pacientes con IFI, fue *C. albicans* con un 47,9% de los casos, seguida de *C. glabrata* (25,7%), *C. parapsilosis* (14,8%), *C. tropicalis* (6,7%) y *C. krusei* (2,6%) (25). En general, *C. albicans* representa aproximadamente la mitad de todos los episodios de candidemia, y en conjunto, las cinco especies mencionadas, suponen el 90% de todos los casos (26).

Estas especies predominantes, aunque presentes en todos los sitios, muestran variaciones geográficas, regionales, locales e incluso intrahospitalarias lo que refleja las diferentes condiciones medioambientales de temperatura y humedad, pero

INTRODUCCIÓN

también distintos perfiles de pacientes y actividad que se dan en un mismo centro. Las series publicadas en Estados Unidos coinciden en señalar a *C. albicans* como la especie más frecuente y después a mucha distancia, *C. glabrata*, o *C. parapsilosis* dependiendo del tipo de pacientes y las unidades en donde se aíslan (UCI o no UCI, quemados o no, etc.) (26-28). Esta distribución epidemiológica, sin embargo, no es estática y va evolucionando a lo largo del tiempo como se puede ver en la figura 7.

Figura 7. Tendencia temporal de candidemias en EE.UU. (28)



En otras regiones del mundo como Latinoamérica, *C. glabrata* curiosamente aparece como 3° o 4° patógeno en importancia por detrás de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (24) (29). Este mismo fenómeno se repite en estudios epidemiológicos de Asia (26) donde predominan *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* sobre *C. glabrata*. En Europa, existen diferencias significativas entre el norte y el sur. Mientras que en el norte (Suecia y Alemania) hay más aislamientos de *C. glabrata*; en el sur (España e Italia) predomina *C. parapsilosis* (30).

En nuestro país, existen distintas series publicadas. Una de ellas es la de Almirante *et al.* en Barcelona, que muestra una incidencia de 0,53 episodios/1000 altas, con un claro predominio de *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (31). Otras más recientes de Rodríguez-Hernández *et al.* 2011 en Andalucía con una incidencia similar (0,58 episodios/1000 altas) y un patrón muy parecido de especies (32) y de Pemán *et al.* 2011, en toda España, en el que se confirma el predominio de *C. parapsilosis* sobre *C. glabrata* y *C. tropicalis* y además se evidencia un ligero incremento en los últimos 10 años de *C. glabrata* (33).

Todas estas variaciones en la epidemiología de las candidemias tienen su trascendencia en el momento de elegir una terapia adecuada, ya que un incremento

INTRODUCCIÓN

de especies no *albicans* puede traducirse en un incremento en resistencia a fluconazol lo que implica una mayor dificultad a la hora de elegir un tratamiento empírico.

1c. IMPORTANCIA DE UN DIAGNÓSTICO CORRECTO Y UN TRATAMIENTO ADECUADO PRECOZ EN EL PRONÓSTICO DE CANDIDEMIA.

Existen cada vez más pruebas de que la instauración precoz de un tratamiento adecuado es importante para el pronóstico de la enfermedad. *Parkins et al.* (34) ya pudieron demostrar en una revisión retrospectiva de 5 años de 207 episodios de candidiasis invasora (la mayoría candidemias), cómo la mitad de los episodios se debieron a especies no *albicans* y de entre estas, un 22% fueron debidas a *C. glabrata*. Los autores confirmaron que la terapia empírica adecuada se relacionó directamente con una reducción significativa de la mortalidad, desde el 46% al 27%. Esto se ha corroborado especialmente en pacientes ingresados en unidades de críticos en los que el tiempo hasta iniciar la terapia correcta, un diagnóstico precoz de la propia candidemia y una identificación rápida de la especie infectante, son las principales herramientas en la optimización del manejo de sepsis fúngicas en las UCI (35).

Todo ello ha impulsado el desarrollo de tecnologías que permitan conocer cuanto antes la sensibilidad de la levadura a los antifúngicos. En los últimos años se ha realizado un extraordinario esfuerzo para estandarizar técnicas de sensibilidad a los antifúngicos. Distintos organismos internacionales como el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) en Estados Unidos o el EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) en Europa han puesto a punto metodologías estandarizadas que permiten realizar test de sensibilidad a las especies de *Candida* aisladas en muestras clínicas y conocer los resultados en 24-48 h. Este tiempo, sin embargo es muy importante para determinar la evolución posterior del episodio. Por eso, considerando que hay una estrecha relación entre la especie y la sensibilidad del aislamiento se están intensificando los esfuerzos en la identificación precoz de la especie infectante, ya sea directamente en muestra clínica mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o mediante la identificación rápida de la levadura una vez que ha crecido en un hemocultivo, sin necesidad de esperar al crecimiento 24 h más tarde en un medio de cultivo

INTRODUCCIÓN

sólido. En este sentido se han desarrollado diferentes estrategias: las más sencillas consisten en la identificación “*grosera*” de la levadura en *C. albicans* o *Candida* no *albicans* basándose en la aparición de filamentos o tubos germinales en el propio hemocultivo (36); otros autores han identificado presuntivamente las especies más frecuentes directamente en hemocultivo atendiendo a la velocidad de crecimiento de la levadura en la botella (37). La utilización de determinados viales específicos también podría permitir la identificación rápida de *C. glabrata* ya que al parecer esta crece antes en la botella de hemocultivo anaerobia que en la aerobia (38). Por otra parte, las técnicas de biología molecular también se han aplicado con éxito a este propósito. Se han desarrollado PCR caseras, múltiplex, en tiempo real con análisis de curvas de “*melting*”, etc. que permiten la identificación en menos de 4 h directamente del hemocultivo crecido (39,40). Recientemente, se ha comercializado una técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (PNA FISH) que identifica rápidamente, en unas 2 horas, directamente del hemocultivo, las especies de *Candida* más frecuentemente implicadas (41).

En los últimos años, también los nuevos sistemas de secuenciación rápida como la pirosecuenciación y la proteómica mediante espectrometría de masas han demostrado una gran utilidad en la identificación rápida de los aislamientos.

1d. PIROSECUENCIACIÓN EN LA IDENTIFICACIÓN MICROBIANA.

La invención por Sanger a finales de los años 70 de la técnica de terminación con dideoxinucleótidos para la secuenciación de ADN y su posterior perfeccionamiento con la adición de nucleótidos marcados con fluorescencia en los años 80, permitió un enorme impulso en el avance de esta tecnología. Sin embargo, los grandes costes que la secuenciación requería limitó inicialmente su implantación en la mayor parte de los laboratorios (42). Más tarde, a finales de los años 90 Pál Nyrén patentó su sistema de pirosecuenciación (43) y eso supuso una revolución ya que introdujo simplicidad y abaratamiento de costes en una tecnología inicialmente restringida. Originalmente, el método consiste en una cascada de reacciones enzimáticas que se producen durante el proceso de secuenciación que se realiza mediante la adición secuencial y ordenada de nucleótidos (dNTP) a la reacción:

INTRODUCCIÓN

1. Inicialmente, la ADN polimerasa, va incorporando nucleótidos a la cadena de ADN y en ese proceso se libera pirofosfato (PPi) en proporción equimolar a la cantidad de nucleótidos incorporados.
2. La ATP fosforilasa utiliza el PPi para producir ATP.
3. El ATP es utilizado por la luciferasa, que oxida la luciferina en oxiluciferina, produciendo una cantidad de luz proporcional al dNTP incorporado. Como se conoce qué dNTP se van incorporando cada vez, se va construyendo un pirograma en el que los picos traducen los tipos y la cantidad de nucleótidos que se van uniendo.
4. Finalmente actúa la apirasa, que es una fosfatasa que degrada los nucleótidos no incorporados. Cuando la degradación es completa, se añade un nuevo nucleótido (44) (Figura 8).

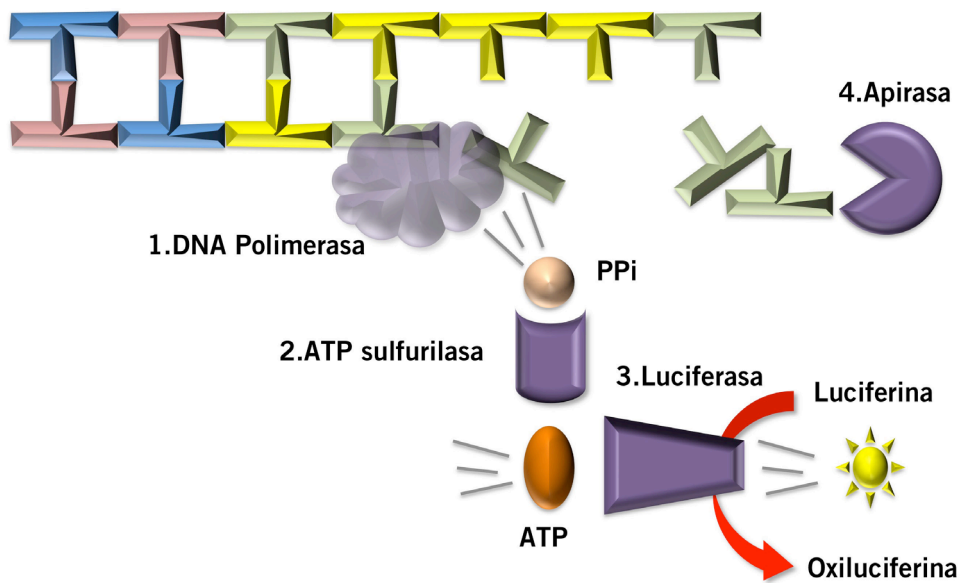


Figura 8. Reacción de pirosecuenciación.

Posteriormente, diferentes modificaciones y adiciones a la técnica, han ido mejorándola hasta convertirla prácticamente en el sistema de elección cuando se trata de sintetizar cadenas cortas de oligonucleótidos: es simple, ya que la lectura es la propia secuencia en lugar de ser una señal fluorescente que luego debe convertirse en una secuencia; es más rápida y barata ya que una secuencia se va leyendo en tiempo real y es sintetizada mediante la incorporación de nucleótidos

INTRODUCCIÓN

no marcados; por último, también es una técnica cuantitativa. Además, aunque la pirosecuenciación original sólo podía leer un máximo de 60 pares de bases (pb), los nuevos sistemas de secuenciación masiva han conseguido alcanzar más de 350 pb (42).

Las aplicaciones en el campo de la microbiología no han hecho más que crecer utilizándose ampliamente en diferentes ámbitos (42,45-47):

1. Bacteriología: tipificación bacteriana (48), genotipado de resistencias e identificación molecular (49).
2. Virología: detección e identificación de nuevos virus o virus poco frecuentes (H5N1, hantavirus...); detección de mutaciones de resistencia a antivíricos (mutación frente a amantadina del virus influenza H1N1); genotipado (HCV, HIV, HPV...) (50).
3. Micología. La pirosecuenciación ha obtenido excelentes resultados en la identificación ultrarrápida de especies del género *Candida* mediante el análisis de fragmentos pequeños (25pb) de la región ITS2. Un ejemplo de un pirograma con el análisis de una *C. parapsilosis* con un 100% de similitud con la base de datos se puede observar en la figura 9.

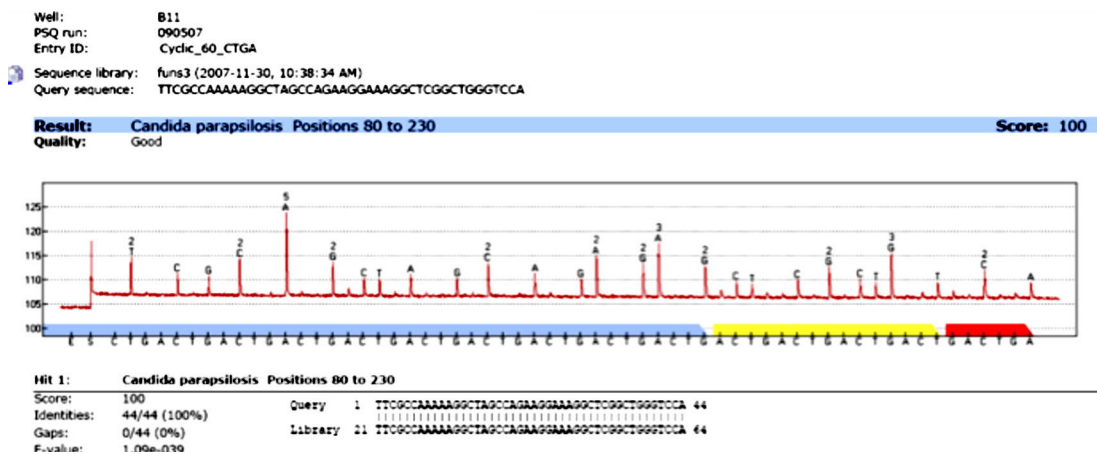


Figura 9.

En definitiva, la pirosecuenciación ha puesto la tecnología de secuenciación de una forma barata y sencilla al alcance del diagnóstico microbiológico. En el terreno de la infección fúngica, está comenzando a ser utilizada para la identificación rápida de especies que hasta ahora requería complejos protocolos que suponían consumo de tiempo y de recursos.

INTRODUCCIÓN

1e. ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN LA IDENTIFICACIÓN MICROBIANA.

1e1. ANTECEDENTES.

La espectrometría de masas (EM) aplicada a la identificación microbiana se inició hace más de 40 años (51). Sin embargo, originalmente la técnica se empleó para el análisis de compuestos lipídicos como las menaquinonas ya que existían limitaciones en la tecnología que restringían el estudio a moléculas menores de 15.000 Dalton. Por tanto el mayor tamaño de las proteínas era un impedimento para su estudio. Posteriormente, la EM combinada con pirólisis para la identificación de micobacterias a través de los productos volátiles de las células completas, demostró que podía ser un sistema fiable y rápido en la identificación de microorganismos más complejos (52). A finales de los 80, el desarrollo de la tecnología de ionización suave con láser (MALDI) extendió su utilidad al estudio de las proteínas (53). Todo esto junto a mejoras de software e instrumentales lograron que ya a mediados de los años 90 el sistema MALDI-TOF comenzara a utilizarse de forma experimental en la identificación de bacterias (54). Aunque inicialmente se analizaban las proteínas de superficie, posteriormente el cambio de matriz empleada permitió la ionización de las proteínas citoplasmáticas, especialmente las más abundantes, las ribosomales que permanecen más conservadas, lo que simplificó la preparación de las muestras (53). El desarrollo significativo de este sistema ha facilitado la aparición de plataformas comerciales que se están utilizando ampliamente en el ámbito del diagnóstico microbiológico.

1e2. SISTEMAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

En el momento actual existen varias tecnologías que permiten utilizar la espectrometría de masas en microbiología clínica, entre ellas destacan: MALDI-TOF, ESI/MS, MALDI/RE y SELDI-TOF.

De todos ellos, el sistema MALDI-TOF es el más extendido y sobre el que ya existen formatos comercializados para su empleo en identificación de aislamientos clínicos. MALDI-TOF, es un acrónimo de la expresión inglesa “*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*” (Ionización/desorción mediante Láser Asistida por una Matriz-Tiempo de Vuelo).

Se transfiere una colonia o una porción de la colonia del microorganismo

INTRODUCCIÓN

problema sobre un soporte sólido que suele ser una placa metálica (Figura 10.1). Sobre esta colonia se deposita una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) y se deja secar a temperatura ambiente. Dicha matriz facilita la ionización suave de la muestra cuando es sometida a un pulso con láser, lo que provoca la desorción de la fase sólida y la ionización de la muestra (Figura 10.2). Los fragmentos ionizados positivamente son impelidos a una columna de ultravacío en donde un campo eléctrico impulsa dichos fragmentos a la columna. Estos fragmentos son fundamentalmente protéicos (riboproteínas) que en función de su tamaño y carga tardarán más o menos en “volar” hasta el detector que se encuentra en el extremo de la columna de vacío (Figura 10.3). Los fragmentos son detectados y eso se traduce gráficamente en unos patrones de picos o espectros, que son propios de cada especie. Dichos espectros se expresan en unidades de masa/carga o en tiempo en nanosegundos (Figura 10.4). Finalmente, la identificación se realiza mediante la comparación de los espectros obtenidos con los de la librería de referencia. Esta se expresa con un índice o “score” que informa del grado de similitud del espectro de la muestra problema con los de dicha librería (Figura 10.5) (55).

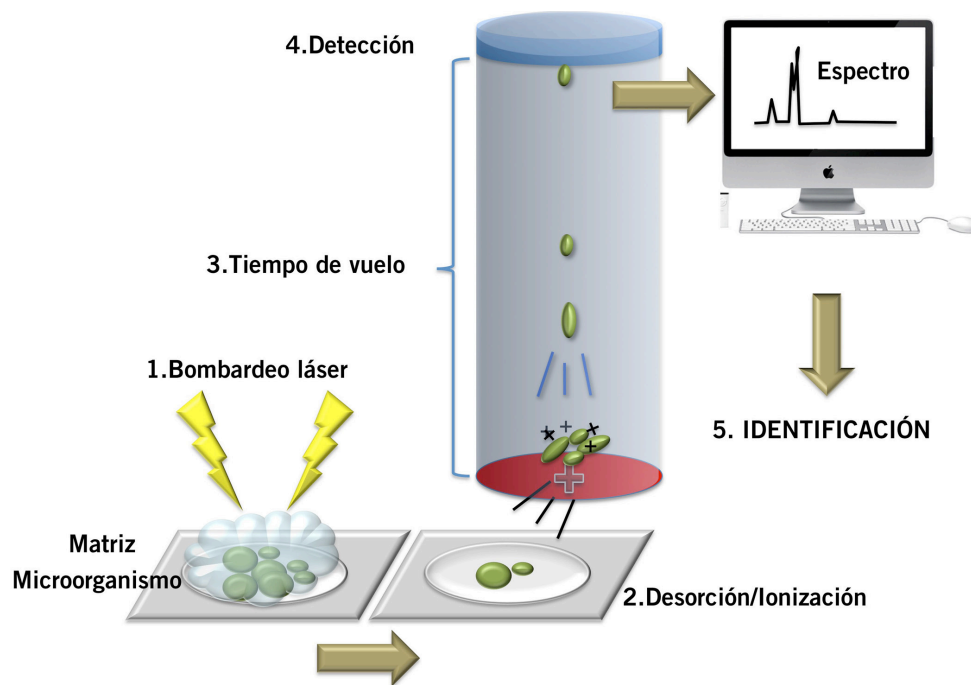


Figura 10. Principio del MALDI-TOF.

INTRODUCCIÓN

ESI/MS son las iniciales en inglés de “Ionización con electrospray/Espectrometría de masas”. El sistema combina “lo mejor de ambos mundos”, ya que la detección del microorganismo se realiza mediante una amplificación genómica utilizando sondas específicas de lo que se quiera detectar y la identificación del amplicón obtenido se realiza mediante espectrometría de masas. Esto permite su aplicación directamente en muestra clínica sin esperar al cultivo. Ya existe alguna plataforma comercial dirigida a su utilización en diagnóstico clínico (56).

El sistema MALDI-RE (*MALDI-Resequencing*) se está utilizando para la tipificación microbiana con resultados similares al *Multi Locus Sequence Typing* (MLST). Básicamente consiste en una amplificación de una diana del microorganismo a estudiar, su transcripción en fragmentos de ARN y posterior realización de un MALDI-TOF con comparación de espectros obtenidos en librerías. Este método permite soslayar la dificultad de aplicar el TOF a amplicones de ADN ya que al parecer éstos se degradan en el ultravacío, algo que no sucede con ARN (53).

Por último, SELDI-TOF (*Surface-Enhanced Desorption/Ionization-Time Of Flight*). Sería un MALDI-TOF, pero en lugar de realizarse sobre una superficie metálica inerte, se hace sobre un “*array*” en el que se seleccionan previamente las proteínas que se van a analizar. Existen ya algunos trabajos interesantes que muestran el potencial de esta tecnología en la identificación y tipificación de especies crípticas de hongos y sus factores de virulencia (57).

1e3. APLICACIONES DE MALDI-TOF EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA.

La irrupción del MALDI-TOF en los laboratorios de diagnóstico microbiológico clínico, ha sido descrita por algunos autores como verdaderamente revolucionaria (58). A su facilidad de manejo y rapidez en la obtención de resultados, se une su versatilidad para identificar un gran número de microorganismos diferentes, desde bacterias hasta hongos. A todo esto hay que añadir otras aplicaciones que se están empezando a desarrollar que amplían enormemente su utilidad en la práctica clínica; detección directamente en muestras, estudios de sensibilidad y estudios de tipificación:

- **MALDI-TOF en identificación bacteriana.**

- **Bacterias aerobias.**

- El rendimiento de la EM en la identificación de las bacterias aerobias comúnmen-

INTRODUCCIÓN

te implicadas en patología humana es muy satisfactorio. Existen innumerables estudios que evalúan la utilidad del sistema. Van Veen *et al.* identificó en paralelo 327 aislamientos clínicos mediante técnicas convencionales combinadas con secuenciación del gen 16S y MALDI-TOF y consiguió identificar correctamente a nivel de especie el 97% de enterobacterias, el 90% en bacilos gram-negativos no fermentadores y estafilococos, y casi el 85% en estreptococos y otros microorganismos fastidiosos (59). Estos resultados se repiten en muchas otras publicaciones dirigidas a la identificación de bacterias aerobias en cultivo sólido.

Bacterias anaerobias.

Aunque existen menos datos, las bacterias anaerobias también se están identificando mediante MALDI-TOF. Sin embargo, en este ámbito los resultados son más discretos con porcentajes de identificación de especie que no superan el 70% (60). Estas limitaciones son debidas fundamentalmente a carencias en las propias librerías de espectros que son la herramienta fundamental para una correcta identificación y es de esperar que vayan minimizándose conforme se vayan incrementando los espectros.

Micobacterias.

Las micobacterias son un grupo más complejo para estudiar con MALDI debido a que tienen una pared más rígida para poder extraer proteínas, y por los problemas de bioseguridad que algunas especies como *Mycobacterium tuberculosis* pueden generar. Existen, no obstante, diversos protocolos que aplicados sobre aislamientos clínicos han dado excelentes resultados con tasas de identificación del 100% (61).

• MALDI-TOF en la identificación fúngica.

Igual que las micobacterias, los hongos poseen una pared muy rígida y difícil de romper. Por ello se han propuesto diversos protocolos basados en la extracción con etanol, ácido fórmico y acetonitrilo para su posterior análisis con un gran éxito en la mayor parte de los grupos:

Levaduras.

Los rendimientos de este sistema son excelentes en la mayor parte de las levaduras de importancia clínica. Existen muchos estudios publicados que así lo corroboran. *Stevenson et al.* (62) fueron uno de los primeros grupos en mostrar la seguridad y precisión de MALDI-TOF en la identificación de aislamientos clínicos. Utilizando una base de datos propia, pudieron identificar correctamente a nivel de especie el

INTRODUCCIÓN

99% de los aislamientos que estudiaron. Un ejemplo de espectros de algunas especies de *Candida* se puede observar en la figura 11.

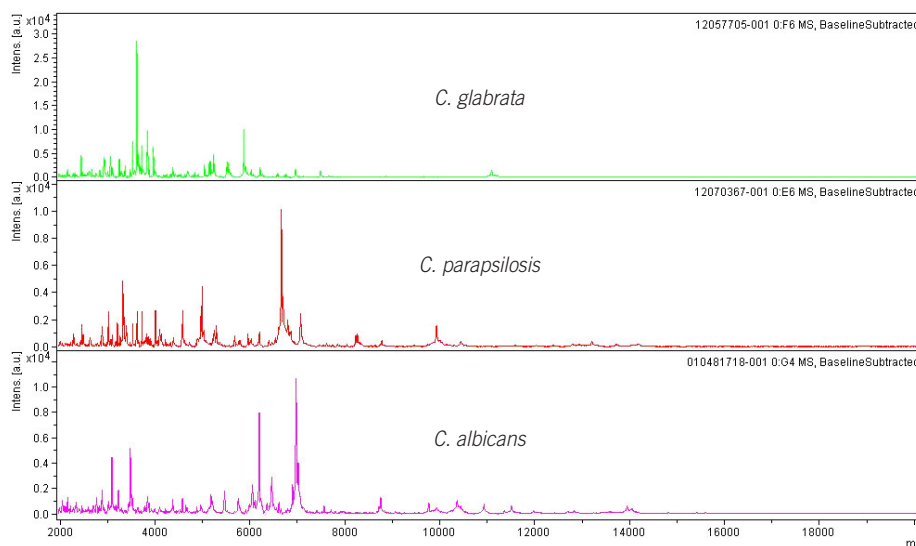


Figura 11. Espectros obtenidos de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*

Hongos filamentosos.

Los hongos filamentosos más frecuentemente relacionados con infecciones profundas en el ser humano pertenecen al género *Aspergillus* y al grupo de los mucorales. Ambos tipos de hongos se están identificando mediante EM con una gran precisión (63,64). Sin embargo, otros hongos con frecuencia implicados en infecciones superficiales de piel y faneras como son los dermatofitos, también se han estudiado con resultados menos espectaculares (65).

• Detección e Identificación directa.

La rápida identificación del microorganismo directamente de la muestra o del hemocultivo crecido supone una ventaja incuestionable en el manejo clínico del paciente porque facilita la instauración de tratamientos antibióticos dirigidos de forma precoz. MALDI-TOF permite la identificación de microorganismos directamente de la orina en infecciones urinarias sin esperar al crecimiento en medios de cultivo habituales, con rendimientos que llegan al 94% de identificación correcta a nivel de especie (66). De igual forma, la espectrometría de masas realizada directamente sobre los frascos de hemocultivos una vez crecidos, permite la identificación correcta

INTRODUCCIÓN

en septicemias del 90% de las bacterias (67) y por encima del 85% de las especies más frecuentemente implicadas del género *Candida* (68,69).

- **Estudios de Sensibilidad.**

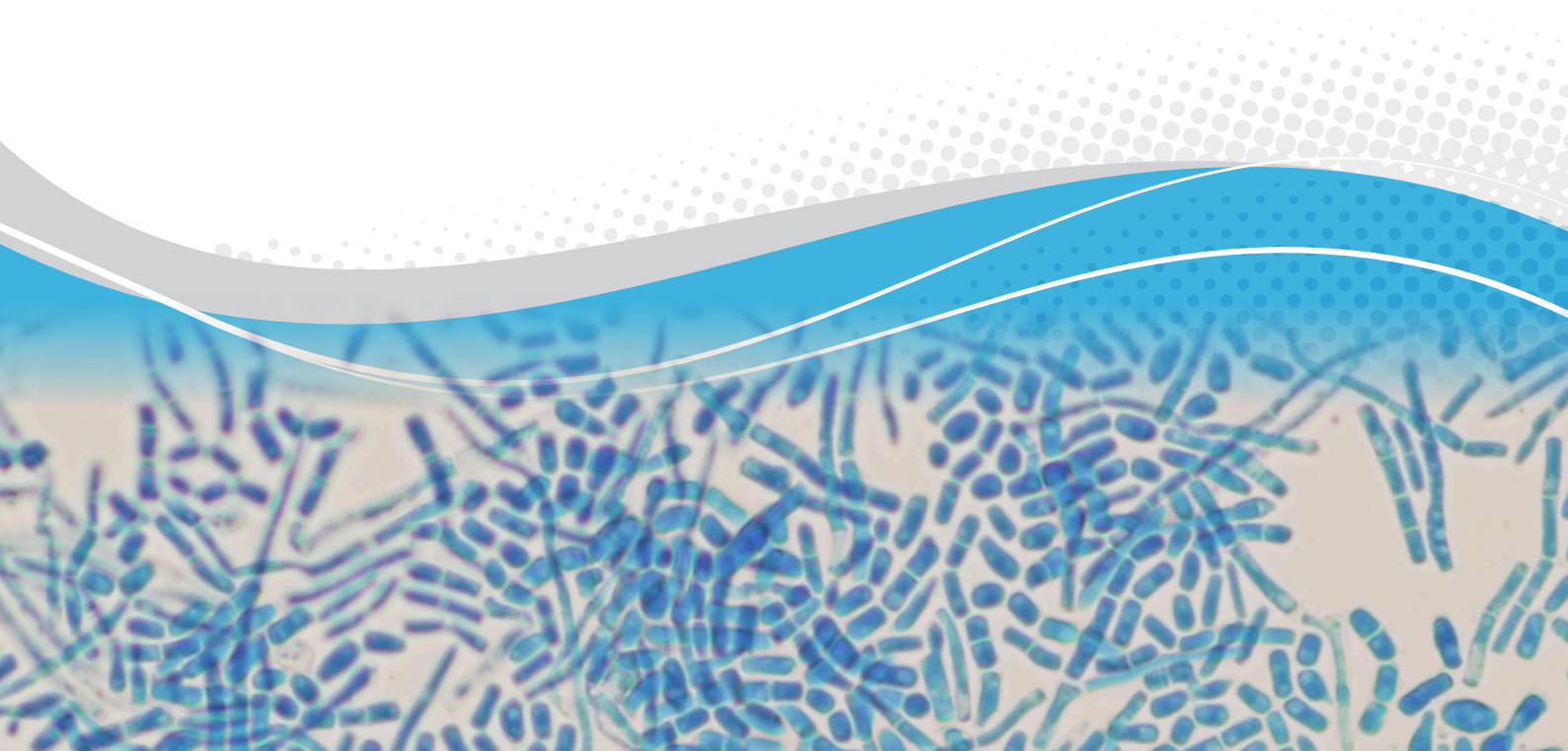
Recientemente, se han descrito algunas aplicaciones de la EM para estudiar la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos o antifúngicos. Tanto la detección de forma fiable de la presencia de enzimas degradantes de antibióticos como betalactamasas o carbapenemasas en bacilos gram-negativos en unas dos horas (70-72); como la realización de antifungigramas con fluconazol y caspofungina frente a *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. (73,74).

- **Estudios de Tipificación.**

Finalmente, la gran capacidad que MALDI-TOF posee para identificar correctamente a nivel de especie e incluso subespecie, abre la puerta a su utilización en los estudios epidemiológicos de poblaciones microbianas para la detección de brotes. Algunos autores ya lo han señalado, llegando a equiparar la potencia de este sistema con las técnicas de estudios de campos pulsados en algunos tipos específicos de bacterias (75).

En definitiva, MALDI-TOF y los otros formatos de EM abren el campo de la proteómica a la microbiología clínica, lo que se va a traducir en grandes progresos en el diagnóstico precoz y adecuación en el tratamiento de muchas patologías infecciosas.

OBJETIVOS



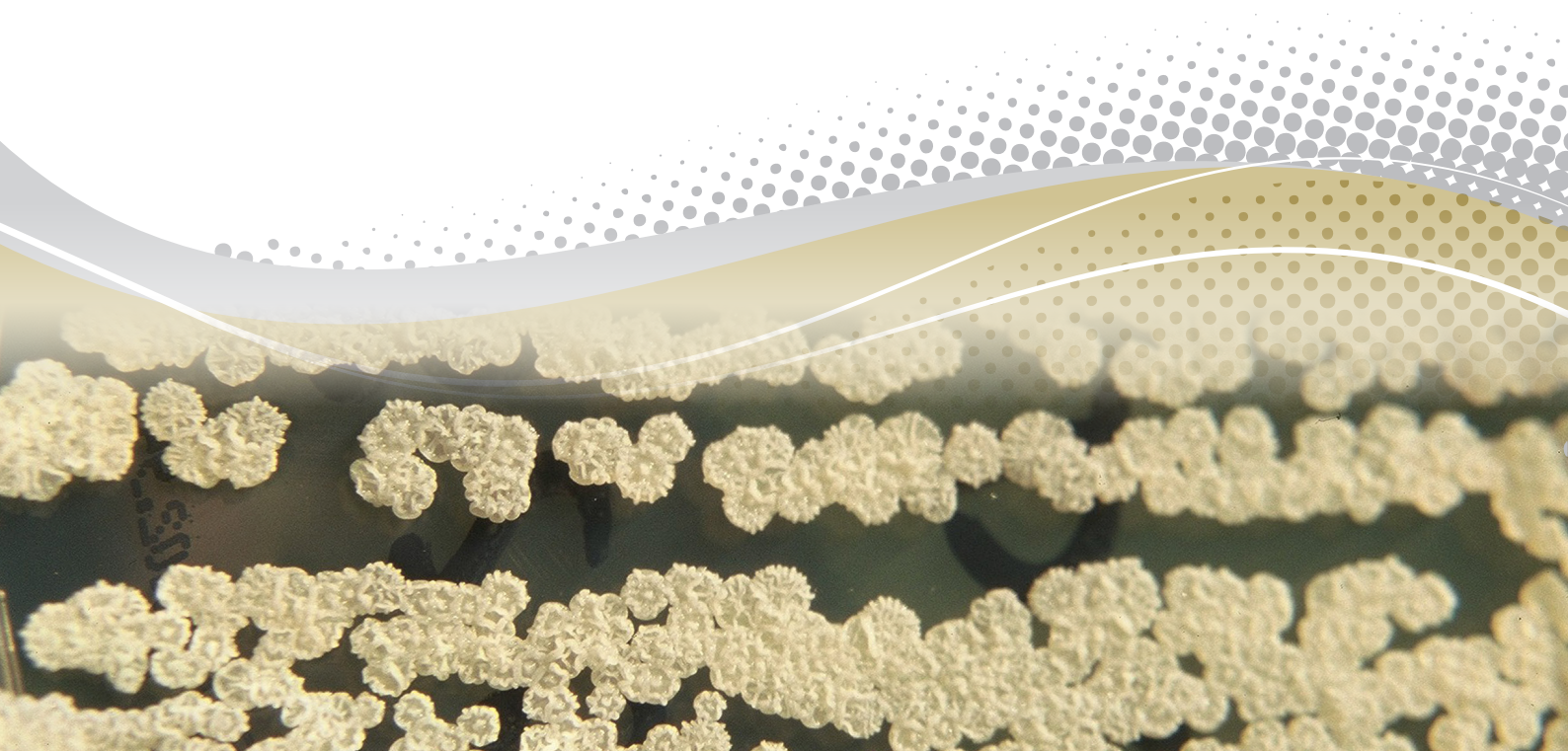
OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

Los objetivos de este estudio son:

1. Estudiar la incidencia de candidemias y la distribución de las especies aisladas en hemocultivo en nuestro medio (nacional y local).
2. Evaluar la utilidad de la pirosecuenciación para la identificación rápida de levaduras en hemocultivos positivos.
3. Evaluar la utilidad del sistema MALDI-TOF para la identificación de levaduras.

MATERIALES Y MÉTODOS





3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3a. EL ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE INCIDENCIA DE CANDIDEMIA Y ESPECIES SE PRESENTA EN TRES SECCIONES:

- 3.a.1. Estudio FUNGEMYCA.
- 3.a.2. Estudio Candipop.
- 3.a.3. Epidemiología local de candidemias desde el año 2000 hasta el 2011 en el Hospital Universitario La Paz.

3a1. ESTUDIO FUNGEMYCA.

Estudio prospectivo, secuencial realizado en un periodo de 13 meses desde el 1 de enero de 2009 hasta el 31 de enero de 2010 entre 44 hospitales terciarios españoles. La distribución de los hospitales participantes según el número de camas fue: hospitales de más de 1000 camas, 41%; entre 600 y 1000 camas, 31,8%; y menos de 600 camas, 27,2%. Todos los centros participantes recogieron e identificaron los aislados de hemocultivos y rellenaron los cuestionarios clínicos y demográficos. Descrito en: "Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, Merino P, Ruiz MT, Pérez L, Linares MJ, Marco F, García J et al. *Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. J Antimicrob Chemother.* 2012;67(5):1181–7.

Definiciones.

Se consideró un episodio de fungemia como el aislamiento de un hongo en hemocultivos de un paciente con signos y síntomas relacionados en el tiempo. Se consideró como fungemia adquirida extrahospitalariamente cuando el hongo se aisló en sangre en las primeras 48 horas después de la admisión en el hospital. Los pacientes se dividieron en grupos de edad en neonatos (menos de 30 días de edad), niños (1 mes- 15 años), adultos (16-64 años) y ancianos (más de 64 años).

Identificación y sensibilidad a antifúngicos.

En cada centro participante se determinó la sensibilidad a antifúngicos y la identificación de todos los aislamientos. Se estudió la sensibilidad a nueve agentes (anfotericina b, fluconazol, caspofungina, micafungina, anidulafungina, voriconazol, posaconazol, itraconazol y 5 fluorocitosina) mediante la técnica colorimétrica

MATERIALES Y MÉTODOS

con microdilución en paneles Sensititre YeastOne® SYO-09 (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH, EE.UU.). Para su interpretación se utilizaron los puntos de corte clínicos del CLSI (76) y también se aplicaron los nuevos puntos de corte especie específicos así como puntos de corte epidemiológicos (ECV) recientemente publicados (77-81). Al no haberse definido todavía puntos de corte clínicos para posaconazol ni anfotericina B, se consideraron aislados resistentes aquellos inhibidos por más de 1 mg/l. En cada centro se utilizaron cepas de referencia como controles: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258.

Identificación molecular del complejo *C. parapsilosis*.

Las identificaciones de aislados de *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* se confirmaron en un laboratorio de referencia según el método descrito por Miranda-Zapico *et al.* (82). Además fueron confirmadas mediante amplificación y posterior secuenciación de las regiones ITS1 e ITS4 de los genes rARN.

Identificación molecular del complejo *C. glabrata*.

La identificación de las especies crípticas del complejo *C. glabrata*, (*C. glabrata sensu stricto*, *Candida nivariensis* y *Candida bracarensis*) se realizó en un laboratorio de referencia según el protocolo descrito por Alcoba-Flórez *et al.* (83).

3a2. ESTUDIO CANDIPOP.

Estudio prospectivo multicéntrico de vigilancia de candidemias realizado entre mayo de 2010 a abril de 2011 en 29 hospitales de 5 regiones de España correspondientes a una población de 7.237.228 habitantes.

Cada episodio se consideró como el primer aislamiento de *Candida* spp. en hemocultivo realizado en el área de vigilancia del estudio.

Se recogieron datos demográficos, clínicos y microbiológicos de cada caso. Se analizó la mortalidad asociada precoz (menos de 7 días) y tardía (8-30 días). Los aislamientos se identificaron mediante secuenciación de la región ITS y la sensibilidad se realizó e interpretó utilizando la metodología y los puntos de corte de EUCAST.

3a3. EPIDEMIOLOGÍA LOCAL DE CANDIDEMIAS DESDE EL AÑO 2000 HASTA EL 2011 EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ.

Se analizaron retrospectivamente los episodios de candidemia ocurridos en

MATERIALES Y MÉTODOS

el Hospital Universitario La Paz (HULP) desde enero de 2000 hasta diciembre de 2011. Se consideró un aislamiento por episodio y se registraron las especies aisladas en los distintos centros hospitalarios del HULP así como la incidencia anual expresada en episodios por 1000 ingresos. Las especies fueron identificadas según los métodos habitualmente utilizados en la rutina de la sección de micología del Servicio de Microbiología del HULP en cada momento.

3b. IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE LEVADURAS EN HEMOCULTIVO MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN.

La evaluación de la pirosecuenciación en la identificación de levaduras en hemocultivo se describe en: “*Quiles-Melero I, García Rodríguez J, Romero-Gómez MP, Gómez-Sánchez P, Mingorance J. Rapid identification of yeasts from positive blood culture bottles by pyrosequencing. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Jan.;30(1):21–4*”.

Se estudiaron hemocultivos con crecimiento de hongo obtenidos en el HULP durante el año 2009. Se emplearon dos sistemas automatizados de hemocultivo:

BacT/Alert 3D (bioMérieux, Inc., Durham, NC, USA) y VersaTREK system (TREK Diagnostic Systems, Inc., Cleveland, OH, USA). Los hemocultivos crecidos fueron teñidos mediante tinción de Gram y tinción fluorescente con blanco de calcoflúor para seleccionar aquellas botellas con crecimiento de levaduras. Todos los aislamientos fueron identificados mediante morfología macroscópica de las colonias en agar cromogénico CHROMagar, (Tec-Laim S.A., Madrid, España) sistema automático VITEK 1 (bioMérieux, Francia) y/o auxonograma API 20 C Aux (bioMérieux, Francia).

Para la reacción de PCR y análisis de la secuencia amplificada se aplicaron 15 µL de muestra del hemocultivo a tarjetas Genocard® (Hain Lifescience, Nehren, Alemania) y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Con un punzón se recogieron pequeñas muestras de la tarjeta (discos de 1mm de diámetro, aproximadamente 5 µL de volumen) y se colocaron directamente en los tubos de reacción de PCR sin ningún tratamiento previo. La reacción de amplificación se realizó con un volumen de mezcla de amplificación de 45 µL al que se añadió el disco de muestra. Se usó Phusion® Blood direct PCR kit (Finnzymes Oy, Espoo,

MATERIALES Y MÉTODOS

Finland), este kit para PCR contiene 2x Phusion® Blood PCR buffer (el cual incluye los dNTPs y MgCl₂) y Phusion® Blood ADN polimerasa. Esta polimerasa está modificada genéticamente, fusionada a la proteína SSB de *Escherichia coli* (*single strand DNA binding protein*), para aumentar la afinidad por el ADN y aumentar la resistencia a inhibidores que se encuentren en la muestra.

Los cebadores “*primers*” utilizados para la reacción eran específicos de una región de 500 pb del 18S rARN y fueron (23) bio-funF (5'-Biotin-ATTGGAGGG-CAAGTCTGGTG-3') y funR (5'-CCGATCCCTAGTCGGCAT-3'). La reacción de PCR consistió en una etapa inicial de 5 minutos a 94°C; 40 ciclos de 20s a 94°C, 20s a 54°C y 40s a 72°C y una etapa final de 5 min a 72°C.

Los productos amplificados fueron sometidos a pirosecuenciación según el método descrito por Gharizadeh *et al* (2004) (84). Los cebadores de secuenciación utilizados fueron funS (5'-YTCAMAGTAAAAGTCCTGG-3') o funS2 (5'-TCA-AAGTAAAAGTCCTGGTTC-3'). La pirosecuenciación se llevó a cabo mediante el sistema Pyromark ID siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Las reacciones de secuenciación fueron hechas con 40 µL de la reacción de PCR y 20 ciclos de dispensación de los 4 nucleótidos con un total de 80 dispensaciones de nucleótidos.

Se descartaron las secuencias menores de 30 bp y aquellas de calidad pobre y similitud con las bases de datos inferior al 85%. Para la identificación de las secuencias, estas se compararon con una base de datos local usando el programa Identifire (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). La base de datos contenía secuencias de 100bp correspondientes a las regiones secuenciadas. Se construyeron dos bases de datos: una contenía 40 secuencias de los hongos clínicamente más relevantes descargadas de Genbank y otra que contenía secuencias de *Candida* descargadas de la base de datos del proyecto SILVA rARN (<http://www.arb-silva.de/>).

Para estudiar la reproducibilidad de la pirosecuenciación directa de los hemocultivos, se recogieron muestras de 6 botellas en tarjetas y se secuenciaron varias veces.

3c. IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE LEVADURAS MEDIANTE EL SISTEMA MALDI-TOF.

La utilidad del sistema MALDI-TOF en la identificación rápida de levaduras se evaluó en dos estudios:

MATERIALES Y MÉTODOS

3c1. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL COMPLEJO *C. parapsilosis*.

En un primer estudio se evaluó esta tecnología en la identificación rápida de especies crípticas del complejo *C. parapsilosis*. Descrito en: “Quiles-Melero I, García Rodríguez J, Gómez-López A, Mingorance J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Jan.;31(1):67–71”.

Se recogieron 77 aislamientos clínicos de *C. parapsilosis sensu lato* previamente identificados mediante pirosecuenciación como *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* o *Candida metapsilosis*. Además se utilizaron 25 aislamientos caracterizados en el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Microbiología (17 *C. parapsilosis*, 5 *C. orthopsilosis* y 3 *C. metapsilosis*). También se incluyó una cepa de referencia de *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Inicialmente, los aislamientos clínicos fueron identificados como *C. parapsilosis* mediante técnicas fenotípicas usadas en la rutina diagnóstica: cultivo en agar cromogénico CHROMagar *Candida* (Tec-Laim), VITEK 1 (BioMérieux, Marcy l’Etoile, Francia) o auxonograma API 20 C Aux (BioMérieux). El ADN de las levaduras se extrajo utilizando Ultraclean Microbial DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, EE.UU.).

Pirosecuenciación.

El ADN se purificó mediante el sistema Ultraclean Microbial DNA isolation kit® (MoBio) que incluye una etapa de lisis mecánica. Posteriormente se amplificó mediante PCR un fragmento de la región ITS1 utilizando los cebadores Bio-ITSF (5'-biotin-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITSr (5'-TCCGTTGTTGAAAG-TTTTAC). El programa de amplificación incluyó una incubación durante 5 minutos a 95°C seguida de 45 ciclos: 95° durante 30 segundos, 45°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos y una extensión final de 3 minutos a 72°C. Se secuenciaron dos regiones diferentes del amplicón utilizando los cebadores ITSr e ITSS (5'-GAGTTTAATCTCTGGCAGGC) y el kit Pyrogold SQA en un pirosecuenciador PyroMark ID (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de referencia (5) obtenidas de Genbank (*accession numbers* AJ635316, AJ698048, AJ698049) mediante el software Identifire® (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania).

MATERIALES Y MÉTODOS

MALDI-TOF.

El análisis se realizó sobre colonias crecidas en agar cromogénico a 35°C durante 48-72h. Las muestras se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante para la identificación de hongos. Porciones de colonias fueron resuspendidas en 300 µL de agua químicamente pura y 900 µL de etanol absoluto (grado HPLC). Después de dos ciclos de centrifugaciones a 13.000 rpm durante 3 minutos y decantación del sobrenadante, el sedimento una vez evaporado el etanol fue resuspendido en un volumen igual de ácido fórmico al 70% y acetonitrilo. Tras una nueva centrifugación, un microlitro del sobrenadante se colocó en el pocillo de la placa metálica del sistema (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca la preparación se le añadió 1 µL de matriz de ácido α -ciano-4-hydroxi-cinámico y se dejó secar a temperatura ambiente. La espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH) con software Flex Control. El sistema se configuró en un modo lineal positivo con una frecuencia láser de 20 Hz y detección de un rango de masas de 2.000 a 20.000 Da. Los parámetros del instrumento fueron: fuente de iones 1 a 20 kV, fuente de iones 2 a 18,5 kV, lentes a 8,5kV, impulsos de iones de 250 ns. El espectro obtenido sumando los espectros de 240 disparos láser en grupos de 30 disparos sobre el pocillo estudiado se comparó mediante el software MALDI-Biotyper 2.0 (Bruker Daltonik GmbH) con una librería de espectros de referencia proporcionada por el fabricante (Librería 3.0.1.0) que contenía espectros de las 3 especies del complejo: espectros de 11 cepas de *C. parapsilosis*, de 2 *C. metapsilosis* y de 3 *C. orthopsilosis*. Para cada cepa la librería contenía un listado de picos con información de 70 picos de diferentes intensidades con un rango de masas de 3000 a 14000 Da. Los espectros fueron externamente calibrados utilizando un estándar del fabricante (Bruker Daltonik GmbH).

3c2. ESTUDIO MALDI-YEAST RING.

En este segundo estudio se evaluó la capacidad del MALDI-TOF en la identificación de especies de levaduras frecuentes y menos frecuentes en patología humana, utilizando dos librerías y con diferentes protocolos.

Se recibieron desde el centro de referencia holandés CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda) 35 cepas identificadas molecularmente mediante secuenciación de las regiones ITS y D1, D2 que son regiones variables del

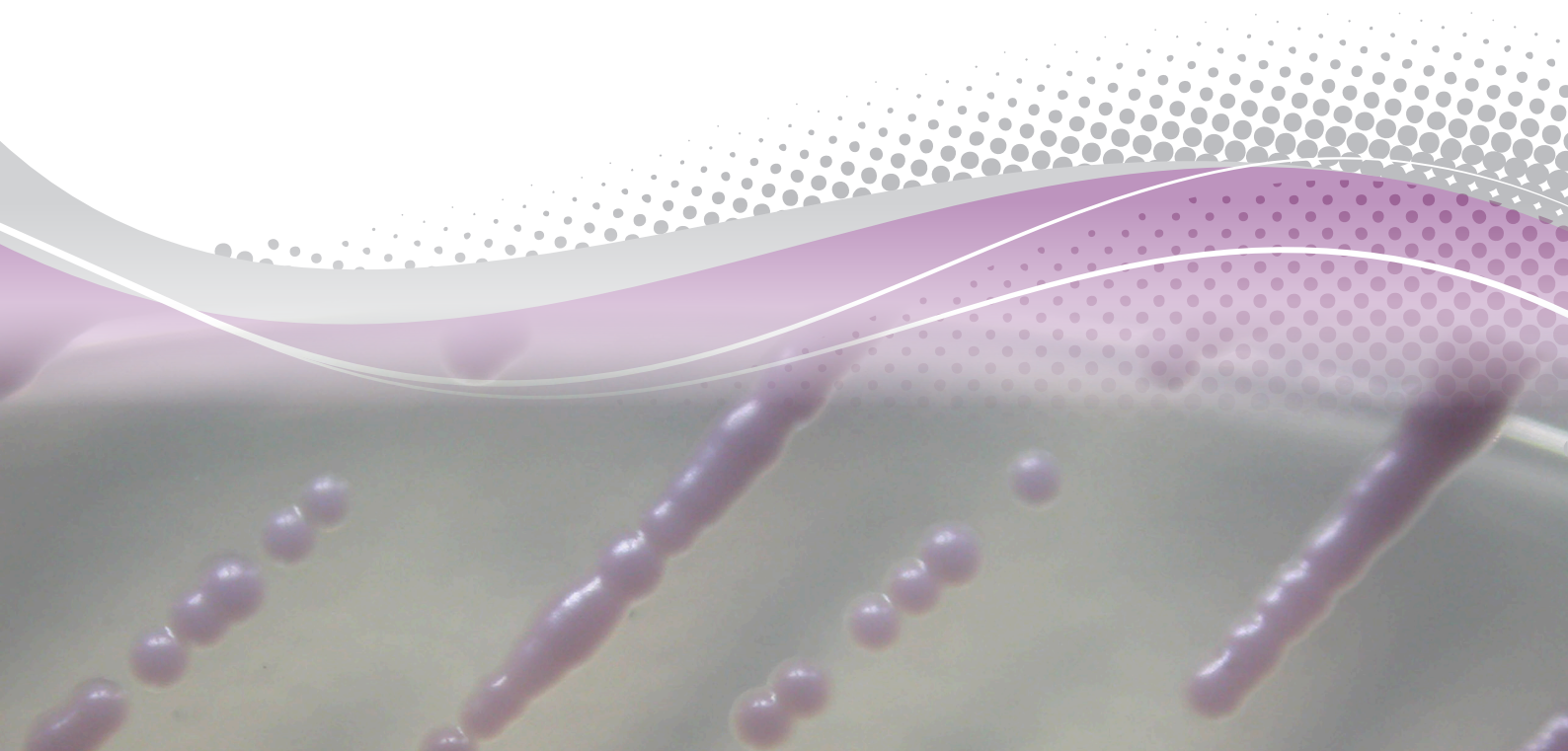
MATERIALES Y MÉTODOS

extremo 5' del gen de la subunidad mayor rADN, pertenecientes a 6 géneros y 28 especies. Estas se reaislaron en medio de Sabouraud glucosa y se incubaron a 36°C durante 48 h o más (hasta obtener un crecimiento visible del aislado). Cada cepa fue procesada a ciegas e identificada por duplicado mediante MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) utilizando tres protocolos diferentes:

1. Se aplicó directamente la colonia sobre el pocillo de la placa metálica (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Se dejó secar a temperatura ambiente y se añadió 1 µL de matriz. Se secó a temperatura ambiente y se realizó el análisis. Este es el método básico que se utiliza para la identificación de la mayoría de las especies bacterianas a partir de colonias.
2. Se aplicó la colonia sobre un pocillo de la placa metálica, se dejó secar a temperatura ambiente, se añadió 1 µL de ácido fórmico al 70%. Tras secarse a temperatura ambiente se añadió 1 µL de matriz HCCA. Una vez secado a temperatura ambiente, se realizó la espectrometría.
3. Se realizó el procedimiento de extracción recomendado por el fabricante. Brevemente, se resuspendió la colonia en estudio en 300 µL de agua químicamente pura. Después se añadieron 900 µL de etanol absoluto, grado HPLC. Se centrifugó un par de veces durante 2 minutos a 30.000 rpm para eliminar el sobrenadante. Posteriormente, se dejó secar el sedimento para permitir la evaporación completa de cualquier resto de etanol que pudiera quedar. Una vez seco, se añadió en la misma proporción que había de sedimento, ácido fórmico al 70% y acetonitrilo. Tras una nueva centrifugación durante 2 minutos a 30.000 rpm, se recogió 1 µL de sobrenadante y se depositó en un pocillo de la placa metálica. Una vez seco, se dispensó 1 µL de matriz para su posterior procesamiento mediante MALDI-TOF.

Finalmente, los espectros obtenidos se compararon con la base de datos del fabricante (Bruker-BD 3.0.1.0) y con una base de datos enriquecida en especies de hongos con 510 nuevas entradas (CBS-BD) que se añadió a la base de datos del fabricante utilizando el software MALDI-Biotyper 2.0 (Bruker Daltonik GmbH).

RESULTADOS



RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4a. RESULTADOS ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS.

4a1. ESTUDIO FUNGEMYCA.

Estudio multicéntrico realizado en 44 hospitales de todo el territorio nacional en 2009-2010 en el que se estudió tanto la incidencia como la distribución de especies.

La incidencia global de candidemia fue de 0,92 episodios/1000 admisiones (rango 0,18-2,2). Los datos de incidencia de los episodios causados por las especies más frecuentes se muestran en la tabla 2.

	Localización en el momento de la fungemia (%)			Incidencia/ 1000 ingresos
	UCI	NO UCI	TOTAL (%)	
<i>C. albicans</i>	230 (48)	385 (42,9)	615 (44,7)	0,412
<i>C. parapsilosis</i>	127 (26,5)	239 (26,6)	366 (26,6)	0,222
<i>C. glabrata</i>	45 (9,4)	113 (12,6)	158 (11,5)	0,107
<i>C. tropicalis</i>	41 (8,6)	72 (8)	113 (8,2)	0,076
<i>C. orthopsilosis</i>	7 (1,5)	23 (2,6)	30 (2,2)	0,020
<i>C. krusei</i>	6 (1,3)	21 (2,3)	27 (2)	0,018
Otras especies	13 (2,7)	26 (2,9)	39 (2,8)	0,025
Otros géneros	10 (2,1)	16 (1,8)	26 (1,9)	0,019
<i>Fusarium spp</i>	0	3 (0,3)	3 (0,2)	0,002
Total	479 (34,8)	898 (65,2)	1377	0,925

Tabla 2. Distribución de especies y características demográficas de pacientes con candidemia

Se recogieron 1357 episodios de fungemia, entre los que cabe destacar que *C. orthopsilosis* fue la 5ª especie más frecuente. Los episodios de fungemia fueron más frecuentes entre pacientes hospitalizados en zonas no UCI que en UCI y en pacientes de edad más avanzada (46,4%). Las especies aisladas fueron *C. albicans* (44,66%), *C. parapsilosis* (26,58%), *C. glabrata* (11,47%), *C. tropicalis* (8,21%), *C. orthopsilosis* (2,18%), *C. krusei* (1,96%), *C. lusitaniae* (0,94%), *Cryptococcus neoformans* (0,73%), *C. guilliermondii* (0,65%), *C. famata* (0,44%), *Trichosporon asabii* (0,36%), *C. dubliniensis* (0,29%), *C. metapsilosis* (0,29%), *Rhodotorula glutinis* (0,94%), *Rhodotorula mucilaginosa* (0,22%), *Candida kefyr* (0,15%), *Candida pseudotropicalis* (0,075%), *Saprochaete capitata* (0,07%), *Saccharomyces cerevisiae*

RESULTADOS

(0,07%), *Trichosporon mucoides* (0,07%) y *Debaryomyces etchellsii* (*Pichia etchellsii*) (0,07%). No hubo ningún aislamiento de *C. nivariensis* ni *C. bracarensis*.

Hubo únicamente 20 episodios de fungemias mixtas (1,5%) por dos o más especies, y se originaron fundamentalmente en áreas de críticos (50%).

4a2. ESTUDIO CANDIPOP.

En el estudio multicéntrico epidemiológico realizado en 2010-2011 en 29 hospitales españoles, se registraron 767 episodios de candidemia con un total de 781 aislamientos lo que representó una incidencia general de 0,9 episodios/1000 ingresos. En 14 casos (2%) se identificaron simultáneamente dos especies diferentes de *Candida*. Del total de especies identificadas, 349 fueron *C. albicans*, 190 *C. parapsilosis*, 102 *C. glabrata*, 59 *C. tropicalis*, 15 *C. krusei*, 13 *C. guilliermondii*, 10 *C. lusitaniae* y otras 43 de especies menos frecuentes.

Utilizando los criterios de EUCAST (resistencia a fluconazol con CMI \geq 4 mg/L) se pudo observar que los porcentajes de aislamientos resistentes a fluconazol fueron: *C. albicans* 1,7%; *C. parapsilosis* 5%; *C. glabrata* 40%; *C. tropicalis* 35% entre las especies infrecuentes, el 28%. Globalmente el porcentaje de aislados potencialmente resistentes a fluconazol fue del 22%.

La distribución porcentual de especies se refleja en la figura 12.

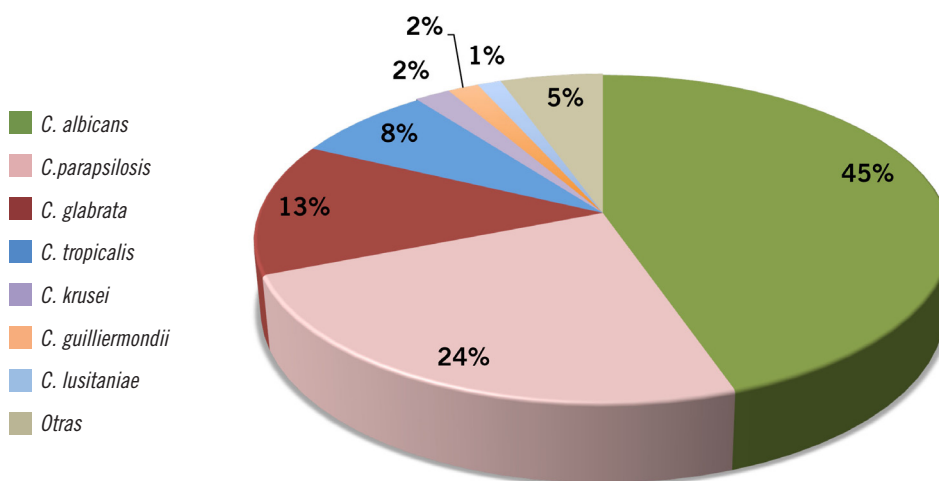


Figura 12. Distribución porcentual de especies.

En conjunto, el 55% de las candidemias fueron originadas por especies no *albicans* que son las que presentan mayores tasas de resistencia a fluconazol.

RESULTADOS

4a3. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ.

Los resultados del estudio epidemiológico realizado en los aislamientos clínicos de levaduras en los hemocultivos del HULP revelan que entre los años 2000-2011 se recogieron un total de 720 episodios de candidemia lo que supuso una media de 60 episodios/año con un rango de 34-82 episodios. La incidencia de candidemia por 1000 ingresos creció en términos absolutos desde 0,66 casos/1000 ingresos en 2000 hasta 0,97 casos en 2011; mostrando un pico máximo de incidencia en 2006 con 1,4 episodios/1000 ingresos. En 11 ocasiones se aislaron al menos dos especies diferentes en el hemocultivo y en un caso se aislaron hasta 3 especies diferentes en el mismo hemocultivo (*C.tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. parapsilosis*). En conjunto, las candidemias mixtas supusieron un 1,5% del total. La evolución de los episodios y la incidencia se muestran en la figura 13.



Figura 13. Evolución del número de episodios de candidemia (barras verdes) e incidencia anual (línea roja).

Globalmente, la especie predominante fue *C. albicans* con 309 episodios, seguida de *C. parapsilosis* con 251, *C. glabrata* con 75, *C. tropicalis* con 41, *C. guilliermondii* 13, *C. lusitaniae* 12 y *C. krusei* 10. Otras especies y géneros se aislaron en 46 episodios. Los porcentajes de distribución de especies se muestran en la figura 14.

RESULTADOS

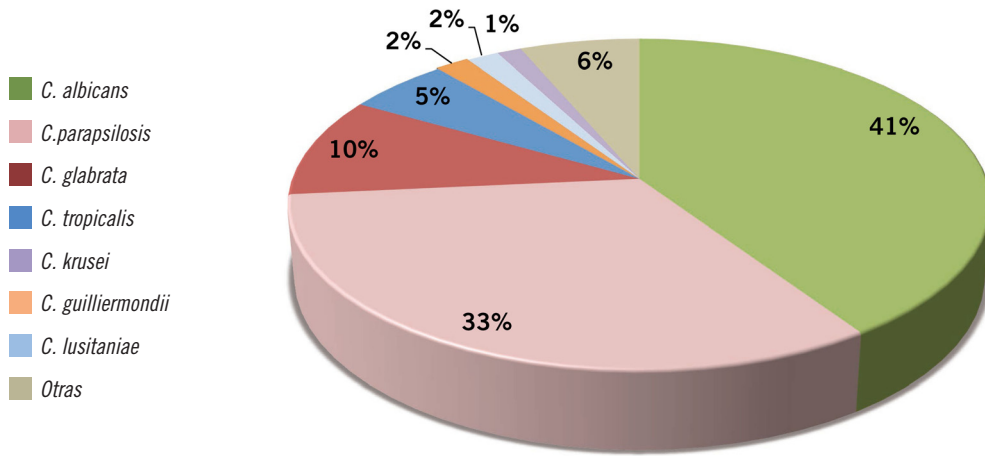


Figura 14. Proporción de especies aisladas.

Aunque inicialmente la especie predominante fue *C. parapsilosis*, a partir del año 2004 predominó *C. albicans* que ha permanecido hasta el momento actual. El resto de las especies se mantuvieron a mucha distancia aunque se observó un incremento lento de *C. glabrata* y de otras especies y géneros menos convencionales (Figura 15).

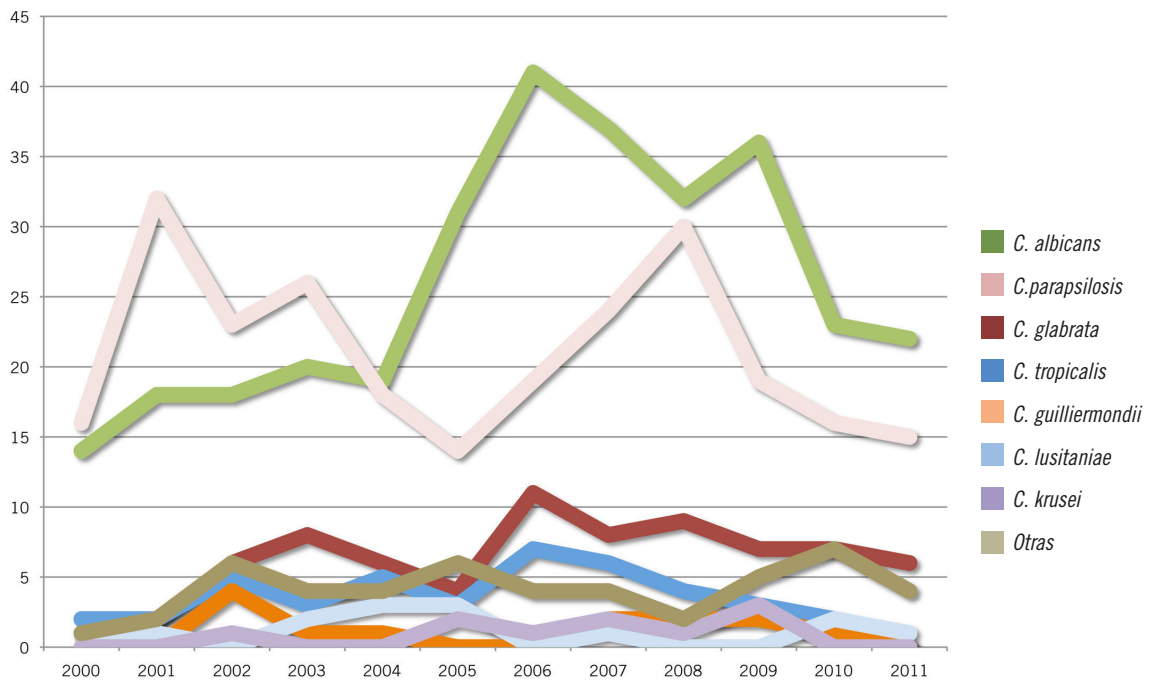


Figura 15. Evolución temporal de las especies aisladas en hemocultivo.

RESULTADOS

Los datos completos de incidencia por año así como las especies aisladas se muestran en la tabla 3.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
<i>Candida albicans</i>	14	16	18	20	19	31	41	37	32	36	23	22	309
<i>Candida glabrata</i>	1	2	6	8	6	4	11	8	9	7	7	6	75
<i>Candida guilliermondii</i>	1	0	3	1	1	0	0	2	2	2	1	0	13
<i>Candida lusitanae</i>	0	1	0	2	3	3	0	1	0	0	2	1	12
<i>Candida parapsilosis</i>	16	32	23	25	18	14	19	24	30	19	16	15	251
<i>Candida tropicalis</i>	2	2	5	3	5	3	7	6	3	3	2	0	41
<i>Candida krusei</i>	0	0	1	0	0	2	1	2	1	3	0	0	10
<i>Candida dubliniensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Candida famata</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>C. pseudotropicalis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Candida pelliculosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Candida lipolytica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Candida pulcherrima</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Candida sp</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>S. cerevisiae</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
<i>T. beigeli</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>C. neoformans</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2
<i>M. pachydermatis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>R. glutinis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. capitata</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>R. mucilaginosa</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	4
EPISODIOS	34	54	58	58	49	60	82	80	74	70	54	47	720
Incidencia/1000 ingresos	0,66	1,03	1,12	1,11	0,88	1,02	1,40	1,34	1,34	1,38	1,12	0,97	

Tabla 3. Especies aisladas en hemocultivos 2000-2011.

4b. IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE LEVADURAS EN HEMOCULTIVOS POSITIVOS MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN.

Se seleccionaron 48 hemocultivos positivos que mostraron estructuras fúngicas en un examen en fresco con blanco de calcoflúor. De éstos, 47 contenían levaduras y uno contenía un hongo filamentoso. Se probaron diversos protocolos de extracción y varias polimerasas. Finalmente se escogió el siguiente esquema porque se evitaban las inhibiciones y se obtenían resultados en unas 4 horas: 15 minutos para

RESULTADOS

preparación de la muestra, 1 hora y 30 minutos para la reacción de PCR y 2 horas y 15 minutos para la pirosecuenciación incluyendo preparación de la muestra, reacción de secuenciación y análisis de los resultados (Figura 16).

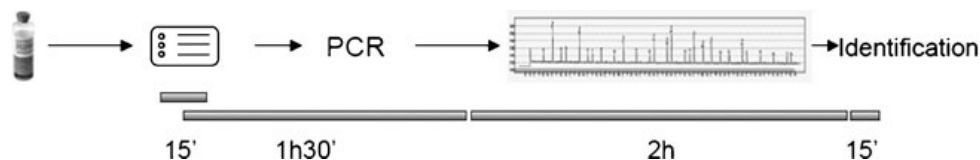


Figura 16. Se aplicaron 15 µL de las botellas con crecimiento fúngico a tarjetas Genocard®. Se recortó un pequeño disco de la tarjeta y se colocó directamente en la mezcla de PCR. El producto amplificado se utilizó directamente en una tarjeta de 96 micropocillos para la pirosecuenciación. Finalmente, la secuencia obtenida se comparó en una base de datos para la identificación.

Las especies identificadas se muestran en la tabla 4.

Muestras	Cultivo	Pir.	Secuencia
24	CAL	CAL	TTCGCCATAAATGGCTACCCAGAAGGAAAGGCTCGGCTGGT
17	CP	CP	TTCGCCAAAAGGCTAGCCAGAAGGAAAGGCTCGGCTGGGT
3	CT	CT	TTCGCCAAAAGGCTAGCCAGAAGGAAAGGCTCGGTTGGGTC
1	CG	CG	TTCGCCGCCAAGCCACAAGGACTTGGGGTTAGCCAGAAGGA
1	CD	CD	TTCGCCATAAATGGCTAGCCAGAAGGAAAGGCTCGGCTGGG
1	CK	CK*	GCCCGAGGGCTAGCCAGAAGGAAAGACCCGGCCGAACAGTG
1	AN	AN	TTCCCCCACAGCCAGTGAAGGCCATGAGGTTCCCCAGAAG

Tabla 4. Secuencias obtenidas por pirosecuenciación con cebadores funS o funS2*.
 CAL: *C. albicans*, CP: *C. parapsilosis*, CT: *C. tropicalis*, CG: *C. glabrata*, CD: *C. dubliniensis*, CK: *C. krusei*,
 AN: *Aspergillus niger*. Pir: Pirosecuenciación.

En 47 muestras se pudo obtener una secuencia legible con el oligonucleótido de secuenciación funS2. La única excepción fue *C. krusei* que tiene dos desajustes o “mismatches” cerca del extremo 5' del oligonucleótido de secuenciación lo que pudo disminuir la eficiencia de la hibridación. Para solventar este problema, se diseñó otro oligonucleótido (funS2) desplazando tres nucleótidos la secuencia hacia la región diana. Utilizando este nuevo cebador de secuenciación, pudieron identificarse directamente todas las especies de las tarjetas. La secuenciación repetida de varias botellas siempre proporcionó resultados consistentes, y tanto la PCR como la pirosecuenciación se pudieron realizar repetidamente sin problemas,

RESULTADOS

incluso de tarjetas que habían sido almacenadas durante semanas a temperatura ambiente. Conviene destacar que el sistema funcionó correctamente con botellas de hemocultivos que contenían partículas de carbón activado y polietanolsulfonato de sodio (SPS) (BacT/Alert FA® y FN®, BioMerieux, Francia). Este tipo de viales están diseñados con carbón u otras resinas que adsorben antibióticos y otros inhibidores del crecimiento y se utilizan muy frecuentemente en clínica porque recuperan más microorganismos si el paciente está en tratamiento antibiótico durante la extracción del hemocultivo. Sin embargo, estos viales presentan numerosos problemas cuando se trata de purificar o amplificar ácidos nucleicos debido a la dificultad que supone separar las células fúngicas del carbón y porque el SPS inhibe la reacción de PCR. Un vial presentó un cultivo mixto de levaduras con *Staphylococcus* Coagulasa Negativa, pero este no interfirió con la secuenciación del hongo. No se encontró ningún cultivo mixto de levaduras.

La comparación y búsqueda en las bases de datos locales permitió la identificación precisa de todas las muestras. La media de nucleótidos leídos fue de 48 bp (rango 41-56) y la media del porcentaje de similitud con la primera propuesta de identificación fue del 91% (rango 80-100). Todos los errores en la alineación se atribuyeron a errores en el recuento del número de nucleótidos en áreas homopoliméricas o a picos “eco” producidos por áreas homopoliméricas de gran longitud en pequeñas fracciones de las moléculas. Este error se dio con frecuencia en secuencias de *C. parapsilosis* ya que tiene una región de cinco adeninas muy cerca del inicio de la secuencia. Estos errores se pudieron corregir manualmente, pero esta circunstancia no modificó la identificación en ningún caso. Todas las identificaciones se confirmaron mediante métodos microbiológicos fenotípicos usados habitualmente en el laboratorio de microbiología.

4c. IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE LEVADURAS MEDIANTE EL SISTEMA MALDI-TOF.

4c1. IDENTIFICACION DE LEVADURAS DEL COMPLEJO C. PARAPSILOSIS MEDIANTE MALDI-TOF.

Se estudiaron 77 aislamientos clínicos identificados como *C. parapsilosis* mediante cultivo en agar cromogénico. La colección se complementó con un grupo de 25 cepas de *C. parapsilosis sensu lato* que habían sido previamente caracterizadas

RESULTADOS

por el Laboratorio de Referencia de Micología del Centro Nacional de Microbiología (12). Para la identificación de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* se utilizaron dos pequeños segmentos de la región ITS entre los genes 18S rARN y 5.8S rARN que constituyen la región ITS1 según las secuencias descritas por Tavanti *et al* (2005)(5). La identidad de todas las cepas de referencia se confirmó por este método, setenta y cinco aislados clínicos se identificaron como *C. parapsilosis* y 2 aislamientos clínicos como *C. orthopsilosis*. (Tabla 5).

	MALDI-TOF	Pirosecuenciación
<i>C. parapsilosis</i> ref.	18	18
<i>C. orthopsilosis</i> ref.	5	5
<i>C. metapsilosis</i> ref.	3	3
<i>C. parapsilosis</i> clín.	75	75
<i>C. orthopsilosis</i> clín.	2	2

Tabla 5. Identificaciones por ambos métodos. Ref: cepa de centro de referencia. Clin: aislamiento clínico.

En las muestras clínicas, la distribución de especies por origen se detalla en la tabla 6.

ORIGEN	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
Hemocultivo	70	1
Líquido ascítico	0	1
Líquido pleural	1	0
Líquido pericárdico	1	0
Líquido sinovial	1	0
Catéter	1	0
Aspirado bronquial	1	0

Tabla 6. Distribución de especies por origen.

Espectrometría de masas.

El análisis con MALDI-TOF de todas las cepas de referencia y aislamientos clínicos se realizó por duplicado de colonias en cultivo puro reaisladas en agar cromogénico tras 48 h de incubación a 36°C. Se realizó una extracción previa con ácido fórmico y acetonitrilo según el protocolo recomendado por el fabricante. El procedimiento generó unos espectros que permitió discriminar claramente entre las especies crípticas (Figura 17).

RESULTADOS

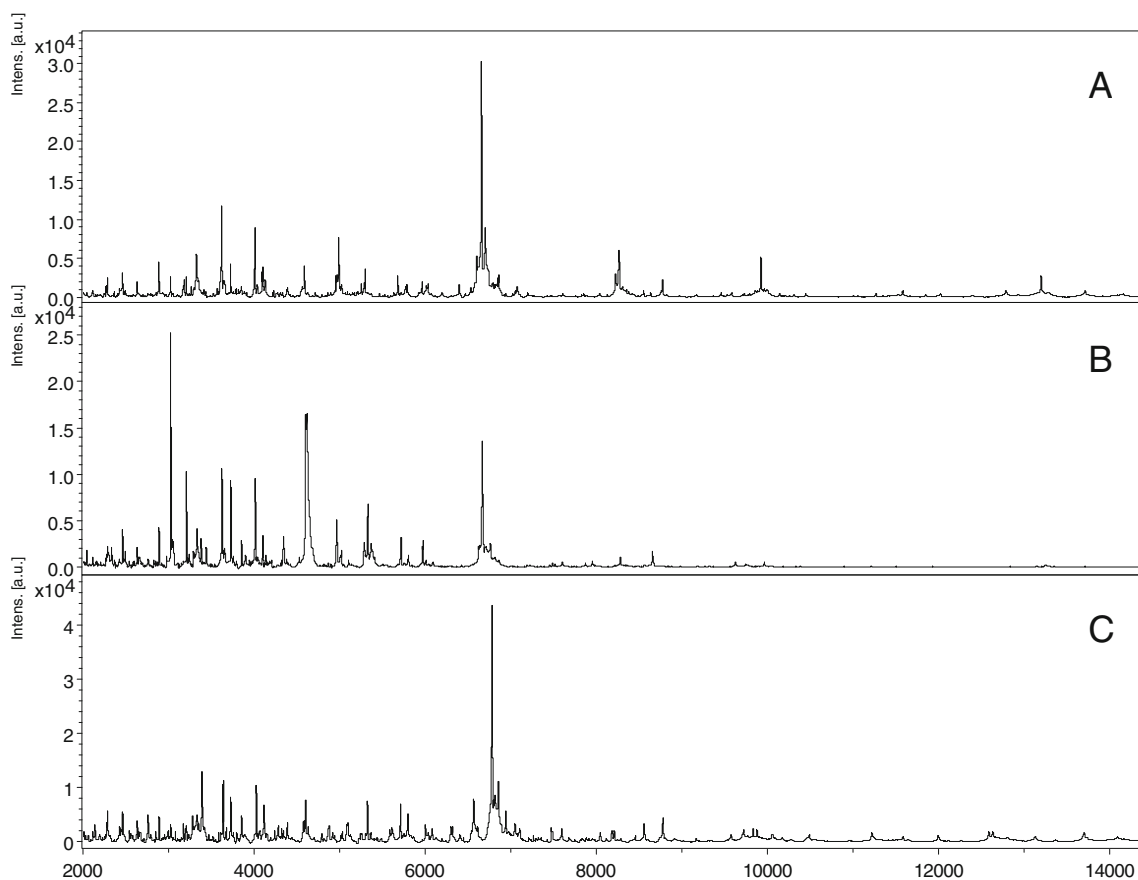


Figura 17. Espectros obtenidos de las 3 especies. A, *C. parapsilosis*. B, *C. orthopsilosis*. C, *C. metapsilosis*.

Las 25 cepas de referencia y los 77 aislados clínicos se identificaron correctamente al nivel de especie y no hubo solapamientos en las identificaciones entre las mismas. La media y desviación estándar de los índices obtenidos fueron 2,12 y 0,009 respectivamente (rango 1,962-2,327) y todos los duplicados mostraron índices similares. No hubo identificaciones ambiguas y la correlación con la pirosecuenciación fue del 100%.

4c2. ESTUDIO MALDI-YEAST RING.

Se recibieron 35 cepas que pertenecían a 6 géneros y 29 especies. Las especies identificadas se muestran en la tabla 7.

Para evaluar la utilidad del sistema MALDI-TOF en la identificación de levaduras de diversos géneros se realizaron 210 ensayos correspondientes al proce-

RESULTADOS

samiento por duplicado de cada una de las cepas y al triple procedimiento: directo, extracción con ácido fórmico y extracción recomendada con etanol-ácido fórmico.

Especie	N	Especie	N
<i>Cryptococcus gattii</i>	1	<i>Candida visnawathii</i>	1
<i>Cryptococcus neoformans var grubii</i>	2	<i>C. dubliniensis</i>	1
<i>Cryptococcus amyloletus</i>	1	<i>C. glabrata</i>	2
<i>Cryptococcus adeliensis</i>	1	<i>C. guilliermondii</i>	1
<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	1	<i>Candida labiduridarum</i>	1
<i>C. neoformans var neoformans</i>	1	<i>Candida zeylanoides</i>	1
<i>Cryptococcus curvatus</i>	1	<i>C. orthopsilosis</i>	3
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	<i>Candida intermedia</i>	1
<i>Trichosporon asahii</i>	2	<i>C.albicans (Candida stellatoidea)</i>	1
<i>Trichosporon inkin</i>	1	<i>Candida haemulonii</i>	1
<i>Galactomyces candidus</i>	1	<i>Candida buenavistaensis</i>	1
<i>C. albicans</i>	2	<i>Yarrowia lipolytica</i>	1
<i>Candida hyderabadensis</i>	1	<i>Kazachstania telluris</i>	1
<i>C. metapsilosis</i>	1	<i>Malassezia pachydermatis</i>	1
<i>C. tropicalis</i>	1		

Tabla 7. Cepas estudiadas.

La extracción completa con etanol y fórmico identificó más cepas que el tratamiento con ácido fórmico y a su vez, este tratamiento fue mejor que el estudio directo sin extracción. De igual forma, los tres métodos pudieron identificar más especies al utilizar la base de datos ampliada (CBS-BD). La media de índices logrados con los distintos ensayos en las identificaciones correctas se muestra en la tabla 8.

Librería/ Método extracción	N	Mín.	Máx.	Media	Desv. típ.
BK-BD /Directa	10	1,466	1,935	1,70260	,160723
CBS-BD /Directa	20	1,438	2,153	1,79150	,197897
BK-BD/ Fórmico	44	1,354	2,222	1,83145	,223235
CBS-BD/Fórmico	51	1,641	2,372	2,08873	,162798
BK-BD/Completa	47	1,425	2,401	2,01070	,248238
CBS-BD/Completa	60	1,645	2,401	2,06178	,197316

Tabla 8. Índices obtenidos en las identificaciones correctas.

RESULTADOS

El procesamiento directo fue el método que menos espectros proporcionó y por tanto el que menos cepas identificó. La extracción recomendada por el fabricante fue el sistema que más y mejores espectros generó y el sistema que mejor identificó. Esta identificación se incrementó al utilizar la librería actualizada (CBS-BD).

En varias ocasiones el sistema identificó erróneamente a nivel de especie con índices mayores de 2. Estas situaciones se consideraron como errores mayores y se produjo fundamentalmente con especies de *Cryptococcus* y *Galactomyces*. Sin embargo, en todos los casos hubo identificación correcta de género. No hubo ninguna identificación errónea a nivel de género con índices superiores a 2. Las identificaciones y los errores de las distintas metodologías se muestran en la tabla 9.

	Directo				Acido Fórmico				Extracción Completa			
	BK-BD		CBS-BD		BK-BD		CBS-BD		BK-BD		CBS-BD	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Id. Especie	10	14,3	20	28,6	44	62,9	58	82,9	47	67,1	60	85,7
Id. Género	0	0	1	1,4	12	17,1	6	8,6	9	12,8	6	8,6
Id. Global	10	14,3	21	30	56	80	64	91,4	57	80	66	94,3
Errores M	0	0	0	0	2	2,9	4	5,7	5	7,1	4	5,7
No Id.	15	21,4	5	7,1	10	14,3	2	2,9	13	18,6	3	4,3
No espect	45	64,3	44	62,9	3	4,3	4	5,7	1	1,4	1	1,4

Tabla 9. Rendimiento de los diferentes protocolos.
Errores M: errores mayores. No espect: no obtención de espectros.

Los errores en la identificación de especies fueron fundamentalmente por no encontrarse en las bases de datos: *C. amylolentus* (En ninguna de las dos librerías); *C. curvatus*, *C. laurentii*, *T. inkin*, *C. viswanathii* y *C. buenavistaensis* que no existían en la BD-BK. También hubo identificaciones incorrectas en algunas subespecies de *C. neoformans* como *C. neoformans* variedad *neoformans* y variedad *grubii*. Por último, hubo errores en la identificación utilizando el método directo sin extracción con especies más comunes como *C. albicans* o *C. glabrata*.

Globalmente, con el protocolo completo de extracción y utilizando CBS-BD, el

RESULTADOS

sistema fue capaz de identificar hasta un 85% a nivel de especie y hasta un 94% a nivel de género. Gráficamente, los resultados se muestran en la figura 18.

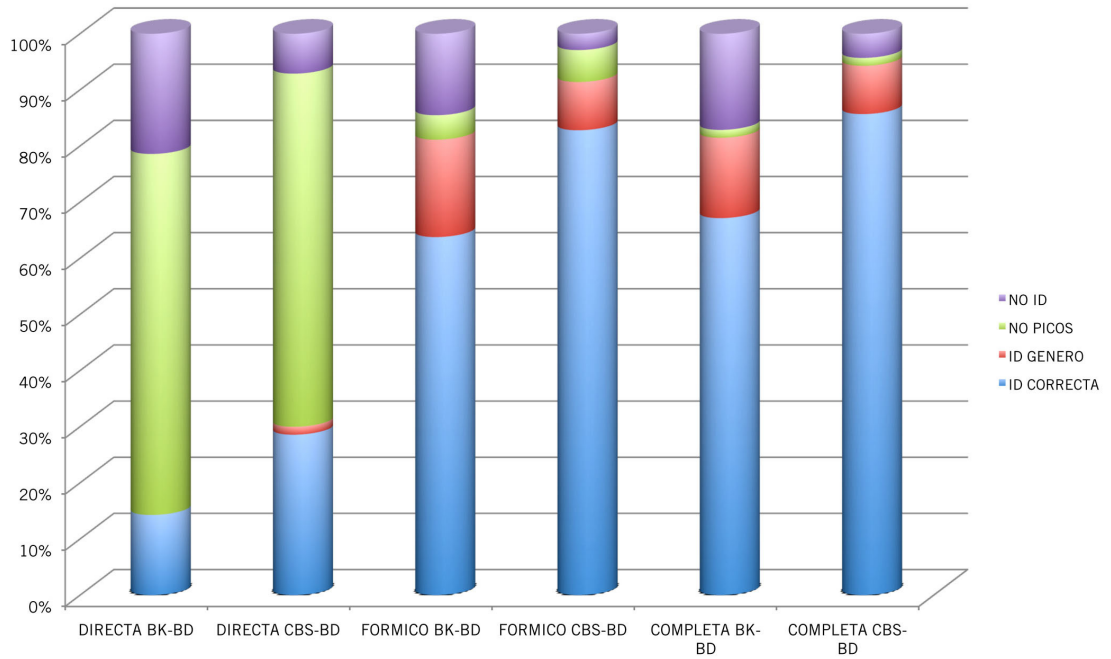
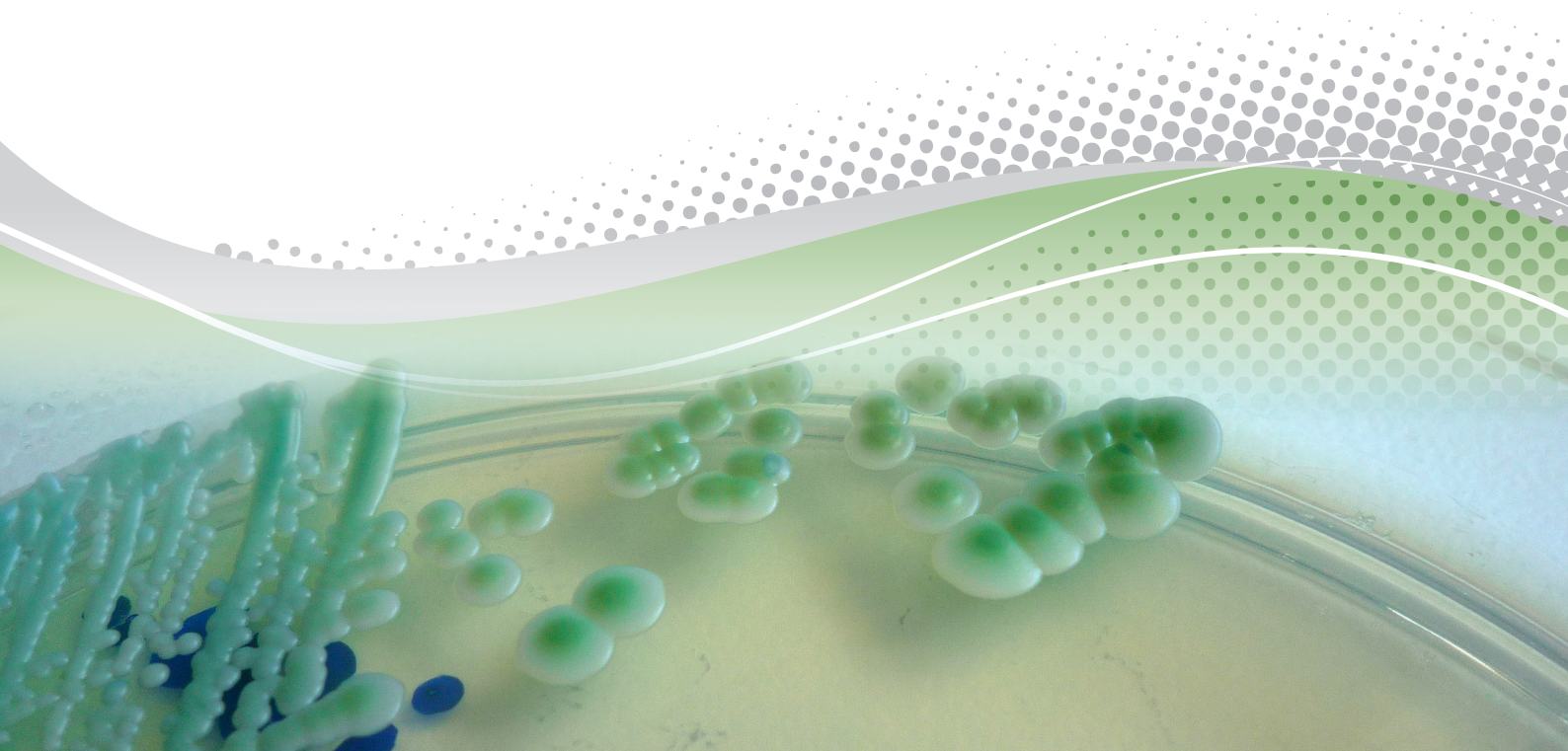


Figura 18. Resultados generales de los diferentes métodos con las distintas librerías.

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN.

5a. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS.

La incidencia de candidemia en los hospitales es muy variada pero todos los estudios coinciden en señalar que esta ha ido incrementándose en los últimos años. En los datos del HULP se puede comprobar como esta ha aumentado desde 0,66 episodios/1000 ingresos registrados en el año 2000 a casi 1 episodio (0,97)/1000 ingresos en el año 2011, con valores máximos de 1,40 episodios alcanzados en 2006 si bien con incrementos y decrementos a lo largo de los años. Un fenómeno muy similar se ha descrito recientemente por Fortún *et al.* en un hospital de características análogas al nuestro en el que las tasas de candidemia crecieron de 0,57 episodios/1000 ingresos en 2000 a 1,52 en 2009 (85). El HULP presenta unas cifras equiparables a lo observado en los estudios multicéntricos FUNGEMYCA y CANDIPOP con una incidencia global de 0,92 y 0,9 respectivamente y algo superiores a los resultados publicados por Almirante *et al.* en Barcelona en 2002 con 0,53 episodios. De igual forma, los episodios de candidemias mixtas fueron similares en las tres series, entre el 1,5-2%. Cuando se comparan nuestros datos con otros países de nuestro entorno, se puede confirmar que se encuentran dentro del rango de otros estudios europeos, con cifras que oscilan entre 0,41-1,09 episodios/1000 ingresos (1,86). En otras latitudes, sin embargo, las cifras son diferentes. Los estudios americanos muestran incidencias algo inferiores con 0,43 casos (1) y los datos publicados por Colombo *et al.* en Brasil son claramente superiores con incidencias de 2,49 candidemias/1000 ingresos (29).

La escasez de series epidemiológicas históricas y la falta de homogeneidad en los criterios a la hora de describir la incidencia, impide realizar estudios comparativos temporales completos. No obstante, algunos autores han podido verificar cómo las tasas registradas en países de nuestro entorno durante la última década del siglo XX fueron sensiblemente inferiores a los datos recogidos actualmente y oscilaron entre 0,20-0,38 episodios/1000 ingresos (30). Se confirma por tanto el incremento de las septicemias por especies de *Candida* en el entorno hospitalario.

Con respecto a la distribución de especies, al comparar los tres estudios (FUNGEMYCA, CANDIPOP y HULP en el periodo 2009-2011) se observa un claro predominio de *C. albicans* con porcentajes muy similares entre el 44 y el 46%, seguido de *C. parapsilosis* con cifras entre el 24-28% y a continuación *C. glabrata* con tasas

DISCUSIÓN

entre el 11 y el 13%. Sin embargo se pueden apreciar diferencias importantes en la proporción de *C. tropicalis* entre los datos del HULP con un escaso 3% y FUNGEMYCA y CANDIPOP con un 8% cada uno. En cuanto a *C. krusei*, sus cifras permanecen en torno al 2% en los tres estudios, confirmándose su escasa importancia cuantitativa como patógeno en nuestro medio y con magnitudes comparables a otras especies como *C. guilliermondii* o *C. lusitaniae*. Conviene destacar la proporción de *C. orthopsilosis* detectada en el estudio FUNGEMYCA (3%) que supone el 5,5% de las *C. parapsilosis sensu lato*. Este hecho no se ha confirmado en los otros dos estudios, pero sí aparece reflejado con cifras similares en torno al 6,1% en recientes publicaciones como el estudio ARTEMIS que incluye aislamientos de candidiasis invasora (no solo de hemocultivo) de diferentes regiones del planeta (87). Otros datos de nuestro país presentan, sin embargo, tasas claramente inferiores, en torno al 1,7% de las candidemias del grupo de *C. parapsilosis* (12). El perfil epidemiológico de los tres estudios se muestra gráficamente en la figura 19. Para evaluar la evolución de las especies responsables de candidemia en los últimos años, es conveniente comparar nuestros resultados con otros estudios nacionales más antiguos: Viudes *et al*, con datos del hospital La Fe de Valencia, publicó en 2002 la epidemiología de los episodios de candidemia ocurridos entre los años 1995 y 1997. En este estudio se muestra a *C. albicans* y *C. parapsilosis* como las más prevalentes, pero destaca la alta proporción de *C. krusei* con un 6,7% por delante de *C. glabrata* y *C. tropicalis* (88). Estos datos pueden reflejar la peculiar epidemiología de un solo centro, sin embargo, un estudio multicéntrico entre 34 hospitales españoles durante los años 1994-1997, mostraba un perfil epidemiológico completamente diferente al actual, presentando a *C. albicans* como el principal patógeno (44,2%) a mucha distancia de *C. parapsilosis* (12,1%) y con unas tasas de *C. glabrata* muy reducidas (3,6%). Llama la atención en este estudio el alto porcentaje de aislamientos de *Cryptococcus* spp. en el hemocultivo, lo que probablemente reflejaba la alta prevalencia de enfermedad invasiva por este género asociada a la infección por VIH (89). Posteriormente, el trabajo publicado por Pemán *et al*. en 2002 sobre candidemias en 19 hospitales españoles ocurridas entre los años 1997-1999 presenta unas cifras similares a las nuestras aunque con un mayor porcentaje de *C. tropicalis* y *C. krusei* (12,7 y 4,2% respectivamente) y un menor porcentaje de *C. glabrata* y otras especies (9,8 y 3,3% respectivamente)(90). En otros estudios realizados más tarde, como el multicéntrico dirigido por Almirante *et al* en 14 cen-

DISCUSIÓN

tros de Barcelona entre los años 2002-2003 (31) se observa un mayor porcentaje de *C. albicans* (51%) y *C. tropicalis* (10%) y *C. krusei* (4%) y unas tasas similares a las de Pemán *et al.* (90) de *C. glabrata* y otras especies (9 y 3% respectivamente) pero inferiores a nuestras cifras. Más recientemente, los datos publicados por Rodríguez-Hernández *et al.* en 17 hospitales de Andalucía entre 2005 y 2006, reflejan unas tasas llamativamente bajas de *C. parapsilosis* (15,6%), de similar orden de magnitud a las obtenidas para *C. tropicalis* (13,3%) y *C. glabrata* (12,4%) (32). Por último, en la revisión de las candidemias ocurridas en el hospital Ramón y Cajal de Madrid en el periodo 2000-2009, se confirman los perfiles obtenidos en nuestra serie, aunque con ligeras variaciones: menor proporción de *C. albicans* (42,2%) y mayor de *C. parapsilosis* (34,4%) (85).

Cuando se comparan nuestros resultados con revisiones epidemiológicas realizadas en otros países de nuestro entorno se comprueba que en Italia, en un estudio reciente de un solo centro, se obtuvo entre 2008-2010 un predominio de *C. albicans* (cerca de un 50%), similares tasas de *C. parapsilosis* a las nuestras (28,4%) y menores de *C. glabrata* (9,5%) (91). Sin embargo, al revisar las series de la European Confederation of Medical Mycology (ECMM) se puede observar cómo en los países del norte, predomina claramente *C. albicans* que puede llegar a ser casi un 67% en Suecia y, sin embargo, *C. parapsilosis* tiene menos importancia cuantitativa, llegando a estar por detrás de *C. glabrata* en el país escandinavo e incluso desplazándose a la cuarta posición en Francia y Alemania por detrás de *C. tropicalis* (30). Este perfil también se reproduce en algunas series de Estados Unidos, donde *C. albicans* constituye el 51%, *C. glabrata* el 22% y *C. parapsilosis* el 14% (26). Sin embargo, el perfil es completamente diferente en algunos países latinoamericanos; en un estudio mejicano, *C. parapsilosis* es mucho más prevalente llegando a ser la más frecuente (92), y en el trabajo de Colombo *et al.*, de Brasil, *C. tropicalis* es la segunda especie más identificada tras *C. albicans* (29).

En general, los estudios epidemiológicos confirman que ha habido un incremento real de la incidencia de candidemia en los últimos años, tal vez como sostienen algunos expertos por el aumento de factores predisponentes (1) y que la epidemiología es diferente entre las distintas regiones geográficas e incluso entre distintos hospitales, lo que posiblemente refleja las diferencias en actividad clínica y población asistida. Sin embargo, a pesar de estas diferencias se observa todavía un claro predominio de *C. albicans*, aunque con un aumento lento pero

DISCUSIÓN

progresivo de otras especies menos sensibles a los antifúngicos clásicamente utilizados.

El conocimiento preciso de la epidemiología de las candidemias en cada centro debe condicionar, más que las guías clínicas, la terapia empírica utilizada con el objetivo de iniciar un tratamiento correcto lo más precozmente posible, de tal forma que en aquellas áreas en donde haya un claro predominio de especies sensibles a fluconazol como *C. albicans* y *C. parapsilosis*, este será el tratamiento de elección. Sin embargo, un incremento de especies como *C. glabrata* o *C. krusei*, obligará a utilizar inicialmente otros antifúngicos como equinocandinas o anfotericina b.

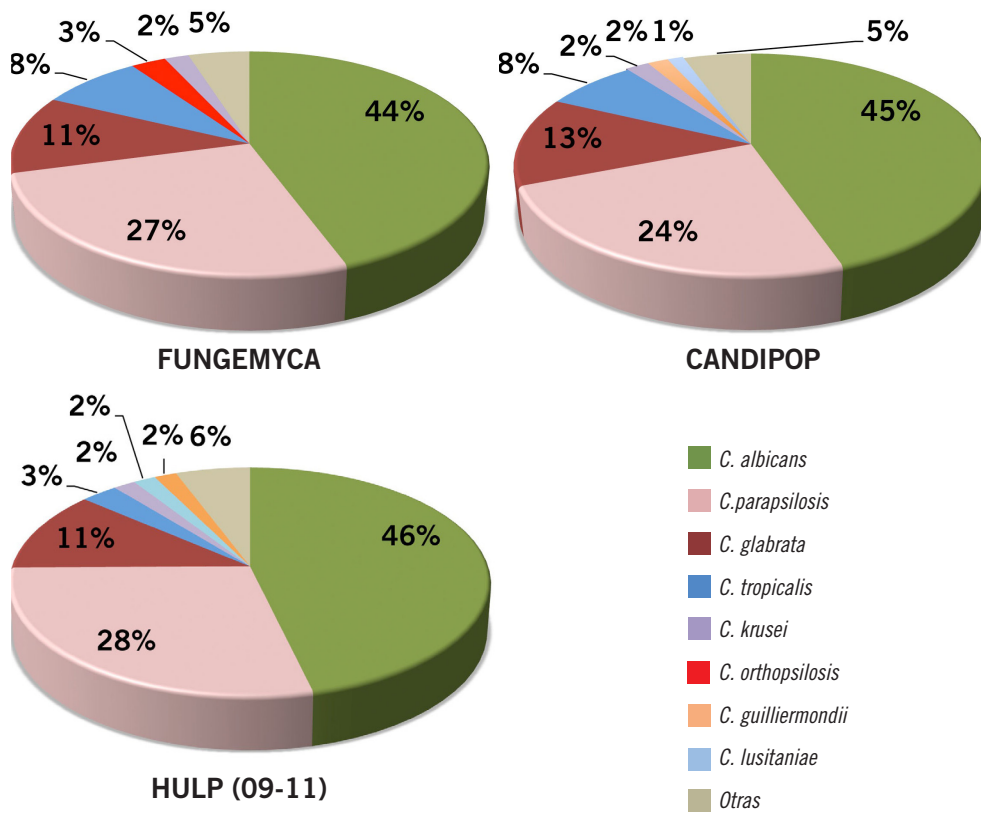


Figura 19. Porcentajes de las diferentes especies detectadas en los tres estudios.

5b. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.

Es importante reseñar cómo en algunos estudios epidemiológicos más antiguos el porcentaje de aislamientos no identificados a nivel de especie era muy significativo, por encima del 30 % (89). Los sistemas microbiológicos de identificación han ido mejorando progresivamente y actualmente, se pueden obtener identificaciones altamente fiables en muy poco tiempo, lo que tiene alcances muy directos en el pronóstico de los pacientes, ya que como anteriormente se ha comentado, una terapia antifúngica adecuada inicial se asocia con una mejora en las tasas de supervivencia (34). En este sentido, los métodos rápidos y seguros de identificación de las especies de *Candida* ya sea mediante pirosecuenciación o con espectrometría de masas, se han mostrado lo suficientemente útiles como para contribuir significativamente a un mejor manejo de estas infecciones, ya que se sabe que las especies no-*albicans* son más resistentes a los antifúngicos que *C. albicans* (36).

El método descrito de pirosecuenciación fue capaz de identificar correctamente los 48 hemocultivos con crecimiento fúngico, 47 levaduras del género *Candida* y un aislamiento de *Aspergillus niger* que excepcionalmente creció en hemocultivo. El sistema requiere 4 horas en identificar el aislamiento y es bastante sencillo, con aproximadamente una hora de tiempo de trabajo real, lo que facilita su introducción en la rutina diagnóstica de un servicio de microbiología clínica. Se han descrito otros protocolos para la identificación de levaduras directamente del hemocultivo crecido, pero o bien utilizan sondas más caras o técnicas relativamente complejas de extracción de los ácidos nucleicos (39,93). La amplificación de ADN desde las tarjetas con muestras sanguíneas ha sido utilizada con éxito con bacterias (94), pero ha sido difícil obtener resultados reproducibles con muestras fúngicas, aunque se introdujeran diferentes lavados en el protocolo. La utilización de una polimerasa más resistente a los inhibidores hizo posible obtener resultados muy reproducibles directamente de los discos empapados de los hemocultivos sin tratamientos adicionales, incluso con botellas que contenían partículas de carbón. La reducción de la preparación de la muestra en nuestro protocolo, con la eliminación del paso de la extracción de ácido nucleico, simplifica significativamente el método y disminuye los costes, facilitando su incorporación a una rutina asistencial. Este sistema podría introducirse en la rutina diagnóstica de las infecciones fúngicas invasoras para reducir hasta dos días el tiempo necesario para iniciar la terapia empírica correcta lo que sería de gran ayuda en el manejo del paciente y reduciría los costes de tratamiento.

DISCUSIÓN

El sistema MALDI-TOF es por otra parte un instrumento muy eficaz y con un enorme potencial para la identificación rápida y segura de las especies de levaduras que se aíslan en patología humana. Existen numerosos trabajos que así lo acreditan, tanto en aislamientos en medios de cultivo sólidos (95-97) como directamente del hemocultivo (69,98). En nuestra experiencia, MALDI-TOF discrimina perfectamente tanto las especies crípticas recientemente descritas como otros géneros y especies menos frecuentes.

La diferenciación de *C. parapsilosis sensu lato* en *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* tiene importancia no solo desde el punto de vista epidemiológico sino desde el punto de vista terapéutico. Las nuevas especies descritas, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* parecen más sensibles a los antifúngicos utilizados actualmente (12,87,99,100) y parecen tener una menor capacidad para formar biopelículas in vitro (100,101). Por otra parte, se ha descrito que *C. metapsilosis* es la menos virulenta de las tres especies en modelos in vitro utilizando líneas celulares de microglía (102). No existen demasiados estudios que describan el papel de cada una de estas especies en patología humana, y esto es básicamente porque no hay un método fenotípico simple para identificarlas. Los sistemas hasta ahora utilizados se basan en análisis genotípicos (RAPD, secuenciación...), son generalmente laboriosos y requieren un tiempo adicional después del cultivo. La tecnología de pirosecuenciación puede obtener unos resultados fiables en 4 h y eso representa una clara ventaja sobre la secuenciación automática basada en el método de Sanger, que requeriría 2 días o más. El sistema MALDI-TOF es capaz de identificar *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* en segundos, y existen numerosos estudios que lo confirman (62,103,104). Estos trabajos utilizaron cepas de referencia para evaluar el método pero no validaron los aislamientos clínicos utilizando un método independiente. En nuestro estudio se ha utilizado un grupo de cepas de referencia previamente caracterizadas pero, además, hemos utilizado la secuenciación de la región ITS1 como método de referencia en los aislamientos clínicos identificados fenotípicamente como *C. parapsilosis*. El sistema MALDI-TOF identificó en cuestión de minutos correctamente las tres especies con un grado de correlación con la referencia del 100%, con una mínima manipulación de las colonias crecidas en CHROMagar *Candida*[®] o en Sabouraud.

Parecidos resultados hemos obtenido en el estudio MALDI-YEAST RING, en el que se identificaron algunos géneros de levaduras menos habituales en el contexto

DISCUSIÓN

clínico junto a especies infrecuentes del género *Candida* y especies más conocidas. La novedad en el estudio es que se ensayaron diversas metodologías y los resultados se compararon con dos bases de datos. El primer método era similar al utilizado en la identificación bacteriana ampliamente descrito en la literatura (105), que consiste en la colocación directa de la colonia sobre la placa metálica del MALDI-TOF sin preparación previa y la posterior adición de matriz. Este sistema fue el que peores resultados proporcionó ya que solo pudo identificar correctamente a nivel de especie el 14,3% con la base de datos del fabricante y el 28,6% con la base de datos actualizada del CBS similar a lo descrito por Pinto *et al* (96). Por el contrario, la extracción proteica completa con etanol-ácido fórmico-acetonitrilo, fue el método que mejor rendimiento dio globalmente llegando a identificar a nivel de especie más del 85% y a nivel de género, el 94,3% de los especímenes. Este sistema, aunque útil, consume tiempo y es más complicado de introducir en la rutina clínica. Por ello, algunos autores han propuesto sistemas que simplifican la extracción (97,106). Al utilizar un sistema simplificado de extracción con ácido fórmico, pudimos comprobar como los rendimientos no se redujeron significativamente respecto a la extracción completa (91,4% vs. 94,3% de identificación global), ahorrando en tiempo de manipulación de la muestra. Por otra parte, nuestros resultados mejoraron significativamente en los tres procedimientos (directo, fórmico y completo) al aplicar la base de datos ampliada, llegando a incrementar en 10,14 y 13 identificaciones más respectivamente. La limitación inherente al número de entradas de la propia base de datos es un fenómeno ampliamente comentado por muchos autores (95,96). Nuestros resultados fueron en conjunto algo inferiores a los publicados por otros investigadores (104), tal vez porque las especies empleadas en nuestro estudio fueron más complejas, como las del género *Cryptococcus* (9 especies) cuya dificultad es atribuida a su gruesa cápsula que dificulta la extracción y solubilización de las proteínas (95,96). Es interesante destacar un error persistente con *Galactomyces candidus*, que fue identificado sistemáticamente como *Geotrichum silvicola*. Esto puede deberse más a un problema de clasificación de esta especie recientemente descrita y su actual ordenación taxonómica que a limitaciones del propio sistema (107,108).

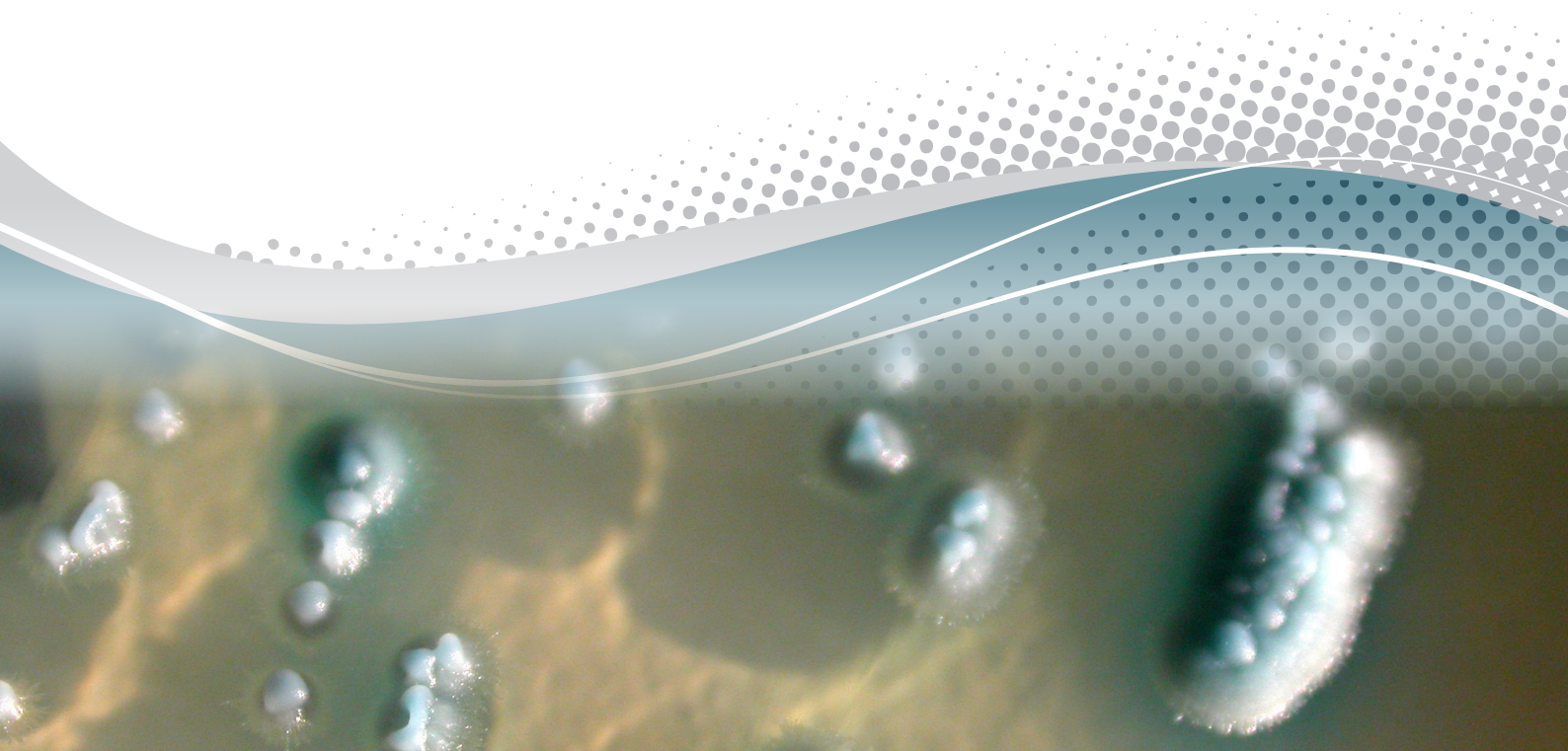
Por último, en varias ocasiones el sistema MALDI identificó a nivel de especie de forma incorrecta con un índice mayor de 2. Este fenómeno ya ha sido descrito por otros autores (97), y como en nuestro caso, ha sucedido con especies que no se encontraban en la base de datos.

DISCUSIÓN

En definitiva, el sistema MALDI-TOF ha demostrado ser una herramienta rápida y segura en la identificación tanto de las especies más comunes aisladas en patología humana como de especies menos convencionales.

Ambos sistemas, pirosecuenciación y espectrometría, proporcionan una información muy valiosa en muy poco tiempo. La espectrometría de masas probablemente constituirá un referente y sustituirá al resto de métodos clásicos de identificación, mientras que la pirosecuenciación se muestra extraordinariamente útil para complementar las limitaciones del MALDI-TOF como la detección directa en hemocultivo, donde este tiene peor rendimiento, especialmente con viales que contienen partículas de carbón, o cuando la especie aislada no se encuentre en la base de datos del sistema y requiera un método adicional basado en secuenciación.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

1. La incidencia de candidemias en nuestro medio hospitalario muestra una tendencia creciente; pasando de 0,64 a 0,97 episodios/1000 ingresos, aunque con importantes variaciones interanuales. Estos resultados son muy similares a los de los estudios nacionales FUNGEMYCA y CANDIPOP con una incidencia de 0,92 y 0,9 episodios /1000 ingresos respectivamente.
2. En nuestro medio, *C. albicans* es la especie más frecuente seguida de *C. parapsilosis*.
3. A lo largo de los años se detecta un incremento lento pero constante de otras especies que pueden ser más resistentes a tratamientos habituales como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y otras menos comunes.
4. La pirosecuenciación es una técnica que permite de forma rápida (4 horas) y segura la identificación de las especies de levaduras en hemocultivos crecidos, incluso si éstos contienen partículas de carbón.
5. El sistema MALDI-TOF, identifica de forma segura y rápida las especies de *Candida* comunes habitualmente aisladas en patología humana, las especies crípticas pertenecientes a complejos de reciente creación y otros géneros de levaduras menos habituales pero ocasionalmente aislados en muestras clínicas.

ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

7. ABREVIATURAS.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ATCC: *American Type Culture Collection.*

ATP: Adenosin trifosfato.

BK-BD: Librería de Espectros de Brüker.

CBS-BD: Librería de Espectros ampliada.

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute.*

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

ECV: *Epidemiological Cut-off Values* (Puntos de Corte Epidemiológicos).

EM: Espectrometría de masas.

ESI/MS: *Electrospray Ionization/Mass Spectrometry* (Ionización con electrospray/
Espectrometría de masas).

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

HCCA: Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico.

HULP: Hospital Universitario La Paz.

IFI: Infección fúngica invasora.

ITS: *Internal Transcribed Spacer* (Espaciador transcribible interno).

MALDI: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (Desorción ionización con láser asistida por una matriz).

MALDI/RE: *MALDI- Resequencing.* (MALDI con resecuenciación).

MLST: *Multi Locus Sequence Typing.*

pb: Pares de bases.

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

PNA FISH: *Peptide Nucleic Acid Probes Fluorescence In Situ Hybridization.*

PPi: Pirofosfato.

RAPD: *Random Amplification of Polymorphic DNA* (Amplificación Aleatoria de ADN Amplificado al azar)

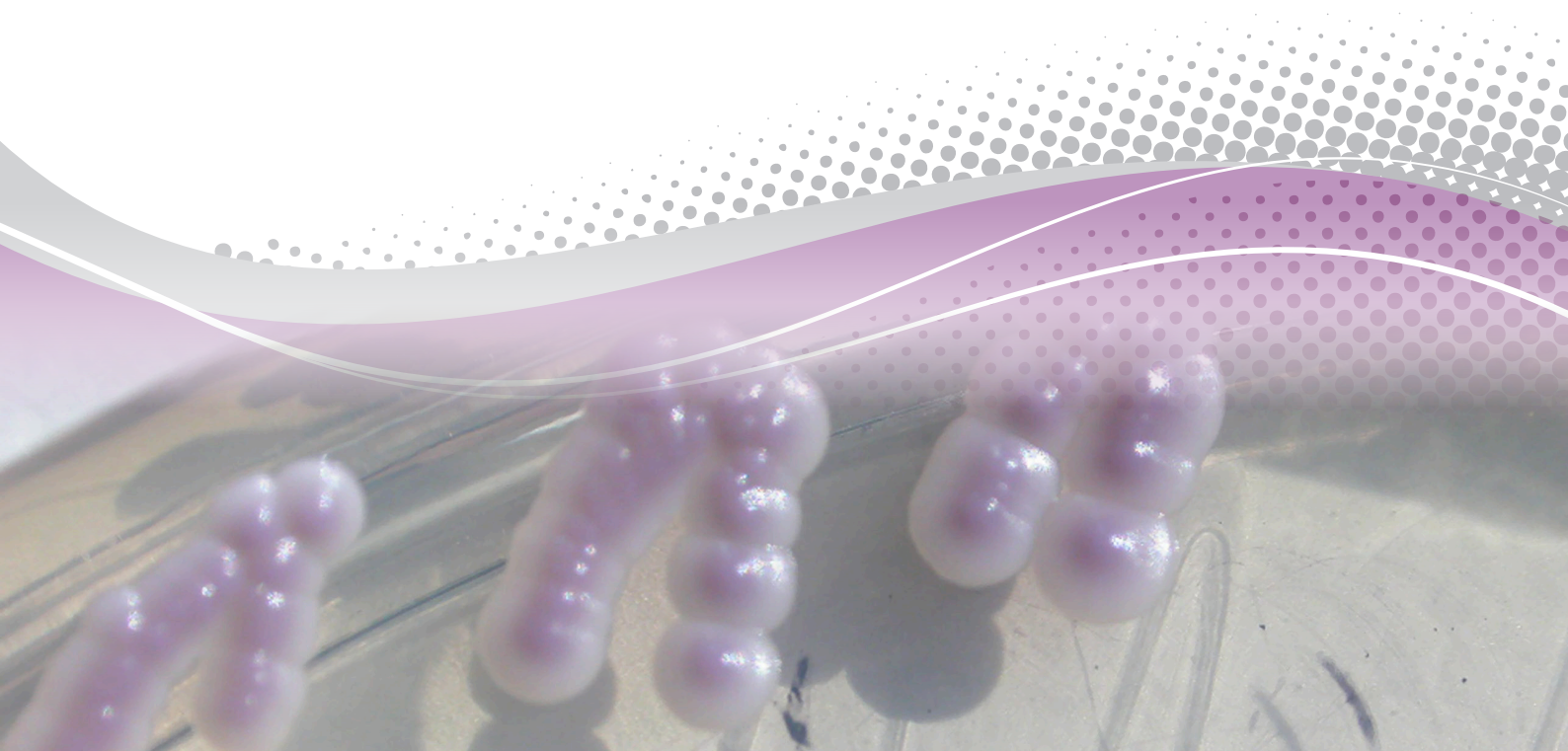
SELDI-TOF: *Surface-Enhanced Desorption/Ionization-Time Of Flight* (Desorción Ionización en una superficie mejorada - Tiempo de Vuelo).

SPS: *Polietanol Sulfonato de Sodio*

SSB: *Single strand DNA binding protein* (proteína de unión de ADN de cadena simple).

TOF: *Time of Flight* (Tiempo de Vuelo).

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Cuenca-Estrella M, Bernal-Martínez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Gómez-López A, Zaragoza O, *et al.* Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32:S143–7.
2. Howell S, Hazen K. *Candida*, *Cryptococcus*, and Other Yeasts of Medical Importance. En Versalovic J, Warnock D, Landry M, Jorgensen J, Funke G, Carroll K, editores. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington DC: ASM Press; 2011. p. 1793–821.
3. Stegehuls G. *Candida* [base de datos en Internet]. mycobank.org. 2000 [acceso 16 de abril de 2012]. Disponible en: <http://www.mycobank.org/BioMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=56219&Fields=All>
4. Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(3):454–500.
5. Tavanti A, Davidson A, Gow N, Maiden M, Odds F. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):284–92.
6. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*. 1995;141:1507–21.
7. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 2011;49(2):171–7.
8. Larone DH. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. 5th ed. Larone D, editor. Washington DC: ASM Press; 2011.
9. Odds FC. *Candida* and candidosis. 2nd ed. London: Baillière Tindall; 1988.
10. Kim SK. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Microbiology*. 2006;152(10):2885–94.
11. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet*. 2009;55(5):497–509.
12. Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Rodríguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodríguez-Tudela JL, *et al.* Prevalence and Susceptibility Profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: Results from Population-Based Surveillance of Candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(4):1506–9.

BIBLIOGRAFÍA

13. Fidel PL Jr, Vázquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev. 1999;12(1):80–96.
14. Roetzer A, Gabaldón T, Schüller C. From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen. FEMS Microbiology Letters. 2010;314(1):1–9.
15. Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. Current Opinion in Microbiology. 2005;8(4):378–84.
16. Lockhart SR, Messer SA, Gherna M, Bishop JA, Merz WG, Pfaller MA, *et al*. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a Large Global Collection of *Candida glabrata* Isolates: Comparison to the Literature. J Clin Microbiol. 2009;47(4):1216–7.
17. Alcoba-Flórez J, Méndez-Álvarez S, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, del Pilar Arévalo M. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. J Clin Microbiol. 2005;43(8):4107–11.
18. Correia A. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56(1):313–7.
19. Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. J Med Microbiol. 2010;59(8):873–80.
20. Ann Chai LY, Denning DW, Warn P. *Candida tropicalis* in human disease. Crit Rev Microbiol. 2010;36(4):282–98.
21. Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. Clin Infect Dis. 1996;22 Suppl 2:S89–S94.
22. Torres-Rodríguez J, del Palacio-Hernanz A, Guarro-Artigas J, Negróni-Briz R, Pereiro-Miguens M. Micología Médica. 1st ed. Torres-Rodríguez J, editor. Barcelona: Masson; 1993.
23. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, *et al*. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009;48(5):503–35.

BIBLIOGRAFÍA

24. Conde-Rosa A, Amador R, Pérez-Torres D, Colón E, Sánchez-Rivera C, Nieves-Plaza M, *et al.* Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center. *P R Health Sci J.* 2010;29(1):26–9.
25. Horn D, Fishman J, Steinbach W, Anaissie E, Marr K, Olyaei A, *et al.* Presentation of the PATH Alliance® registry for prospective data collection and analysis of the epidemiology, therapy, and outcomes of invasive fungal infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;59(4):407–14.
26. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):133–63.
27. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):561–6.
28. Davis SL, Vázquez JA, McKinnon PS. Epidemiology, Risk Factors, and Outcomes of *Candida albicans* Versus Non-*albicans* Candidemia in Nonneutropenic Patients. *Annals of Pharmacotherapy.* 2007;41(4):568–73.
29. Colombo AL. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2816–23.
30. Tortorano AM, Kibbler C, Pemán J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(5):359–66.
31. Almirante B, Rodríguez 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(4):1829–35.
32. Rodríguez-Hernández MJ, Ruiz-Pérez De Pipaon M, Márquez-Solero M, Martín-Rico P, Castón-Osorio JJ, Guerrero-Sánchez FM, *et al.* Candidemias: análisis multicéntrico en 16 hospitales andaluces. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(5):328–333
33. Pemán J, Cantón E, Miñana JC, Flórez JA, Echeverría J, Ortega DN, *et al.* Variación de la epidemiología de las fungemias y de la sensibilidad al fluconazol de los aislamientos de hemocultivos en los últimos 10 años en España: resultados

BIBLIOGRAFÍA

- del estudio FUNGEMYCA. Rev Iberoam Micol. 2011;28(2):91–9.
34. Parkins MD, Sabuda DM, Elsayed S, Laupland KB. Adequacy of empirical anti-fungal therapy and effect on outcome among patients with invasive *Candida* species infections. J Antimicrob Chemother. 2007;60(3):613–8.
 35. Lepak A, Andes D. Fungal sepsis: optimizing antifungal therapy in the critical care setting. Crit Care Clin. 2011;27(1):123–47.
 36. Terlecka JA, Cros du PA, Orla Morrissey C, Spelman D. Rapid differentiation of *Candida albicans* from non-*albicans* species by germ tube test directly from BacTAlert blood culture bottles. Mycoses. 2007;50(1):48–51.
 37. Lai CC, Wang CY, Liu WL, Huang Y-T, Hsueh P-R. Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia. J Med Microbiol. 2012;61(Pt 5):701–4.
 38. Foster N, Symes C, Barton R, Hobson R. Rapid identification of *Candida glabrata* in *Candida* bloodstream infections. J Med Microbiol. 2007;56(Pt12):1639–43.
 39. Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. J Clin Microbiol. 2003;41(12):5660–4.
 40. Cerikçioğlu N, Aksu B, Dal TD, Deniz U, Bilgen HS, Ozek E, *et al.* Seminested PCR for detection and identification of *Candida* species directly from blood culture bottles. New Microbiol. 2010;33(1):57–62.
 41. Reller ME, Mallonee AB, Kwiatkowski NP, Merz WG. Use of Peptide Nucleic Acid-Fluorescence In Situ Hybridization for Definitive, Rapid Identification of Five Common *Candida* Species. J Clin Microbiol. 2007;45(11):3802–3.
 42. Novais RC, Thorstenson YR. The evolution of Pyrosequencing® for microbiology: From genes to genomes. J Microbiol Methods; 2011;86(1):1–7.
 43. Nyrén P. Method of Sequencing DNA Based on the Detection of the Release of Pyrophosphate. EP Patent 0,946,752; 2002.
 44. Anonymous. Principle of Pyrosequencing Technology. QiaGEN, editor. <http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454>. 2012. p. 1–2.
 45. Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. Clin Chim Acta. 2006;363(1-2):83–94.
 46. Borman AM, Linton CJ, Miles S-J, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. J Antimicrob Chemother. 2008;61(Supplement 1):i7–i12.

BIBLIOGRAFÍA

47. Boyanton BL, Luna RA, Fasciano LR, Menne KG, Versalovic J. DNA pyrosequencing-based identification of pathogenic *Candida* species by using the internal transcribed spacer 2 region. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008;132(4):667–74.
48. Fernández-Romero N, Romero Gómez MP, Gómez-Gil MR, Mingorance J. Epidemic population structure of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* determined by single nucleotide polymorphism pyrosequencing. *Infect Genet Evol.* 2011 Oct.;11(7):1655–63.
49. Romero Gómez MP, de Pablos Gómez M, López GL, Mingorance J, Morarillo M, Rodríguez E. *Mycobacterium fortuitum* misidentified as *Corynebacterium jeikeium* in catheter-related bloodstream infection. *Am J Infect Control.* 2011;39(8): 702–3.
50. García-González C, García-Bujalance S, Ruiz-Carrascoso G, Arribas JR, González-García J, Bernardino JI, *et al.* Detection and quantification of the K103N mutation in HIV reverse transcriptase by pyrosequencing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;72(1):90–6.
51. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1975;47(2):219–25.
52. Wieten GG, Haverkamp JJ, Meuzelaar HLH, Engel HWH, Berwald LGL. Pyrolysis mass spectrometry: a new method to differentiate between the mycobacteria of the “tuberculosis complex” and other mycobacteria. *J Gen Microbiol.* 1980;122(1):109–18.
53. Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(11):1604–13.
54. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 1996;14(11):1584–6.
55. Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Micro.* 2010;8(1):74–82.
56. Kaleta EJ, Clark AE, Johnson DR, Gamage DC, Wysocki VH, Cherkaoui A, *et al.* Use of PCR Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Rapid Identification of Bacterial and Yeast Bloodstream Pathogens from Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol.* 2011;49(1):345–53.
57. Pinel C, Arlotto M, Issartel J-P, Berger F, Pelloux H, Grillot R, *et al.* Comparative

BIBLIOGRAFÍA

- proteomic profiles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus lentulus* strains by surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). BMC Microbiol. 2011;11(1):172.
58. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. 2009;49(4):543–51.
 59. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol. 2010;48(3):900–7.
 60. Justesen US, Holm A, Knudsen E, Andersen LB, Jensen TG, Kemp M, *et al.* Species Identification of Clinical Isolates of Anaerobic Bacteria: a Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems. J Clin Microbiol. 2011;49(12):4314–8.
 61. Khéchine El A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Identification of Mycobacteria in Routine Clinical Practice. Heimesaat MM, editor. PLoS ONE. 2011;6(9):e24720.
 62. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) for the Identification of Clinically Important Yeast Species. J Clin Microbiol. 2010;48(10):3482–6.
 63. Alanio A, Beretti J-L, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, *et al.* MALDI-TOF Mass Spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. Clin Microbiol Infect. 2011 May;17(5):750–5
 64. Schrodل W, Heydel T, Schwartze VU, Hoffmann K, Grosse-Herrenthey A, Walther G, *et al.* Direct Analysis and Identification of Pathogenic Lichtheimia Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Analyzer-Mediated Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2012;50(2):419–27.
 65. Theel ES, Hall L, Mandrekar J, Wengenack NL. Dermatophyte Identification Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2011;49(12):4067–71
 66. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM. Rapid

BIBLIOGRAFÍA

- method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(7):1007-12
67. Romero-Gómez MP, Mingorance J. The effect of the blood culture bottle type in the rate of direct identification from positive cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Infect.* 2011;62(3):251-3.
 68. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann A-M, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(11):1631-8.
 69. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, *et al.* Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry Assay of Blood Culture Broths for Rapid Identification of *Candida* Species Causing Bloodstream Infections: an Observational Study in Two Large Microbiology Laboratories. *J Clin Microbiol.* 2011;50(1):176-9.
 70. Hooff GP, van Kampen JJA, Meesters RJW, van Belkum A, Goessens WHF, Luidert TM. Characterization of β -Lactamase Enzyme Activity in Bacterial Lysates using MALDI-Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* 2012;11(1):79-84.
 71. Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011. 30;49(9):3222-7.
 72. Burckhardt I, Zimmermann S. Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry To Detect Carbapenem Resistance within 1 to 2.5 Hours. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3321-4.
 73. Marinach C, Alanio A, Palous M, Kwasek S, Fekkar A, Brossas J-Y, *et al.* MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics.* 2009;9(20):4627-31.
 74. De Carolis E, Vella A, Florio AR, Posteraro P, Perlin DS, Sanguinetti M, *et al.* Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol.* 2012;50(7):2479-83.
 75. Murray PR. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection.* 2010;16(11):1626-30.

BIBLIOGRAFÍA

76. Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martínez L, Cuesta I, Buitrago MJ, *et al.* Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1782–6.
77. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D, Testing TC-SFAS. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat.* 2010;13(6):180-95.
78. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, *et al.* Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat.* 2011 Jun;14(3):164-76.
79. Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Alexander BD, *et al.* Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(3):330-43
80. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, *et al.* Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for the Echinocandins and *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 2010;48(1):52–6.
81. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Third Informational Supplement M27-S3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
82. Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Munoz AJ, Hernández-Molina JM, *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(10):2315–22.
83. Alcoba-Flórez J, del Pilar Arévalo M, González-Paredes FJ, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, *et al.* PCR Protocol for Specific Identification of *Can-*

BIBLIOGRAFÍA

- didia nivariensis*, a Recently Described Pathogenic Yeast. J Clin Microbiol. 2005;43(12):6194–6.
84. Gharizadeh B, Norberg E, Löffler J, Jalal S, Tollemar J, Einsele H, *et al.* Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology. Mycoses. 2004;47(1-2):29–33.
 85. Fortún J, Martín-Dávila P, la Pedrosa de EG-G, Pintado V, Cobo J, Fresco G, *et al.* Emerging trends in candidemia: A higher incidence but a similar outcome. J Infect. 2012;65(1):64–70
 86. Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fuursted K, Johansen HK, Kjaeldgaard P, *et al.* National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). J Clin Microbiol. 2011;49(1):325–34.
 87. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic Distribution and Antifungal Susceptibility of the Newly Described Species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in Comparison to the Closely Related Species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 2008;46(8):2659–64.
 88. Viudes A, Pemán J, Cantón E, Úbeda P, López-Ribot J, Gobernado M. Candidemia at a Tertiary-Care Hospital: Epidemiology, Treatment, Clinical Outcome and Risk Factors for Death. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002;21(11):767–74.
 89. Sota M, Ezpeleta C, Cisterna R. Descripción de 165 episodios de fungemia de un estudio multicéntrico. Rev Iberoam Micol. 1999;16(1):30.
 90. Pemán J, Cantón E, Orero A, Viudes A, Frasquet J, Gobernado M, *et al.* Estudio multicéntrico sobre la epidemiología de las candidemias en España. Rev Iberoam Micol. 2002;19(1):30–35.
 91. Bassetti M, Taramasso L, Nicco E, Molinari MP, Mussap M, Viscoli C. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. PLoS ONE. 2011;6(9):e24198.
 92. Gonzalez GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in Species Distribution and Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida* Collected in Monterrey, Mexico, to Seven Antifungal Agents: Results of a 3-Year (2004 to 2007) Surveillance Study. J Clin Microbiol. 2008;46(9):2902–5.
 93. Gherna M, Merz WG. Identification of *Candida albicans* and *Candida glabrata* within 1.5 hours directly from positive blood culture bottles with a shortened peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization protocol. J Clin Microbiol. 2009;47(1):247–8.

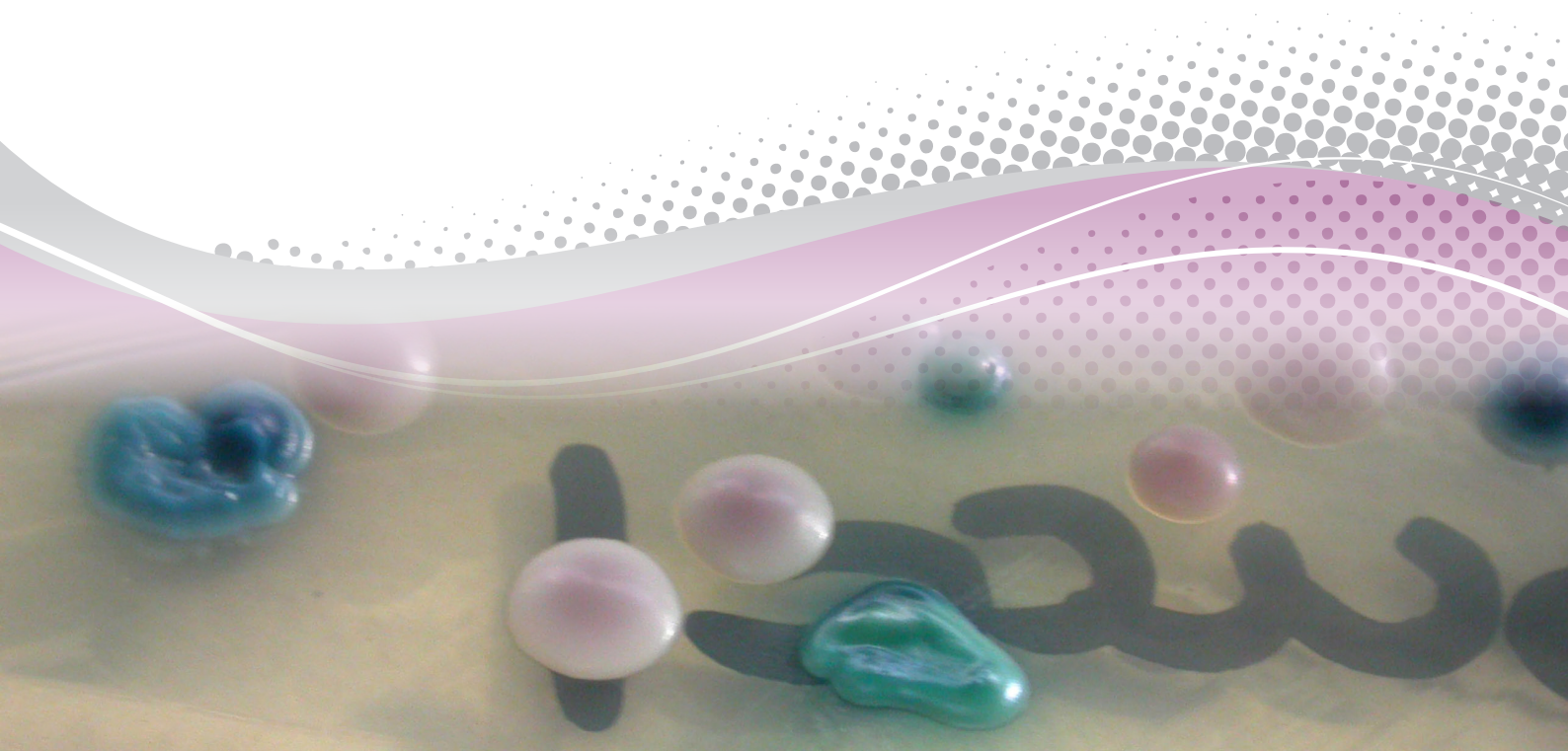
BIBLIOGRAFÍA

94. Eigner U, Weizenegger M, Fahr A-M, Witte W. Evaluation of a rapid direct assay for identification of bacteria and the *mec A* and *van* genes from positive-testing blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):5256–62.
95. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and Cost Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Routine Identification of Yeast. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1614–6.
96. Pinto A, Halliday C, Zahra M, van Hal S, Olma T, Maszewska K, *et al.* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Identification of Yeasts Is Contingent on Robust Reference Spectra. Heimesaat MM, editor. *PLoS ONE.* 2011;6(10):e25712.
97. Iriart X, Lavergne R-A, Fillaux J, Valentin A, Magnaval J-F, Berry A, *et al.* Routine identification of medical fungi by MALDI-TOF: performance of the new VITEK(R) MS using a new time-effective strategy. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):2107-10
98. Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, Gomes J, Djamdjian L, Brossas J-Y, *et al.* Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS ONE.* 2010;5(1):e8862.
99. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J, del Castillo L. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):2194–7.
100. de Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clinical Microbiology and Infection.* 2011;17(3):418–24.
101. Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med. Mycology.* 2011;49(3):253–62.
102. Orsi CF, Colombari B, Blasi E. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the “*C. parapsilosis*” complex. *Med. Mycology.* 2010;48(8):1024–33.
103. Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2009;47(9):2912–7.

BIBLIOGRAFÍA

104. Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2010;17(9):1359–65.
105. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(11):1614–9.
106. Herendael BH, Bruynseels P, Bensaid M, Boekhout T, Baere T, Surmont I, *et al.* Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;31(5):841–8.
107. Pimenta RS. *Geotrichum silvicola* sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus *Galactomyces*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55(1):497–501.
108. Pottier I, Gente S, Vernoux J, Gueguen M. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. *Int. J. Food Microbiol.* 2008;126(3):327–32.

APÉNDICE



Epidemiology, species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey

Javier Pemán^{1*}, Emilia Cantón¹, Guillermo Quindós², Elena Eraso², Julia Alcoba³, Jesús Guinea⁴, Paloma Merino⁵, María Teresa Ruiz-Pérez-de-Pipaon⁶, Luisa Pérez-del-Molino⁷, María José Linares-Sicilia⁸, Francesc Marco⁹, Julio García¹⁰, Eva María Roselló¹¹, Elia Gómez-G-de-la-Pedrosa¹², Nuria Borrell¹³, Aurelio Porrás¹⁴ and Genoveva Yagüe¹⁵ on behalf of the FUNGEMYCA Study Group†

¹Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; ²Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco, Bilbao, Spain; ³Hospital Nuestra Señora de la Candelaria, Tenerife, Spain; ⁴Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ⁵Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain; ⁶Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain; ⁷Complejo Hospitalario, Santiago de Compostela, Spain; ⁸Hospital Reina Sofía, Córdoba, Spain; ⁹Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ¹⁰Hospital La Paz, Madrid, Spain; ¹¹Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain; ¹²Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; ¹³Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain; ¹⁴Hospital Carlos Haya, Málaga, Spain; ¹⁵Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

*Corresponding author. Servicio Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain. Tel: +34-622033355; Fax: +34-962725051; E-mail: pemán_jav@gva.es

†The members of the FUNGEMYCA Study Group are listed in the Acknowledgements section.

Received 3 November 2011; returned 3 December 2011; revised 29 December 2011; accepted 13 January 2012

Objectives: To update the knowledge of the epidemiology of fungaemia episodes in Spain, the species implicated and their *in vitro* antifungal susceptibilities.

Methods: Episodes were identified prospectively over 13 months at 44 hospitals. Molecular methods were used to determine the cryptic species inside the *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* complexes. Susceptibility to amphotericin B, anidulafungin, caspofungin, fluconazole, flucytosine, itraconazole, micafungin, posaconazole and voriconazole was determined by a microdilution colorimetric method. New species-specific clinical breakpoints (SSCBPs) for echinocandins, fluconazole and voriconazole were applied.

Results: The incidence of the 1357 fungaemia episodes evaluated was 0.92 per 1000 admissions. The incidence of *Candida albicans* fungaemia was the highest (0.41 episodes/1000 admissions), followed by *Candida parapsilosis sensu stricto* (0.22). *Candida orthopsilosis* was the fifth cause of fungaemia (0.02), outnumbered by *Candida glabrata* and *Candida tropicalis*. Interestingly, the incidence of fungaemia by *C. parapsilosis* was 11 and 74 times higher than that by *C. orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*, respectively. Neither *Candida nivariensis* nor *Candida bracarensis* was isolated. Fungaemia was more common in non-intensive care unit settings (65.2%) and among elderly patients (46.4%), mixed fungaemia being incidental (1.5%). Overall susceptibility rates were 77.6% for itraconazole, 91.9% for fluconazole and 96.5%–99.8% for the other agents. Important resistance rates were only observed in *C. glabrata* for itraconazole (24.1%) and posaconazole (14.5%), and in *Candida krusei* for itraconazole (81.5%).

Conclusions: Fungaemia is more common in non-critical patients. *C. albicans* is the most common species, followed by *C. parapsilosis* and *C. glabrata*. Nearly 90% of yeasts are susceptible to all antifungal agents tested. Resistance rates change moderately when applying the new SSCBPs.

Keywords: candidaemia, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida metapsilosis*, *Candida nivariensis*, *Candida bracarensis*, incidence, antifungal agents, *in vitro* susceptibility

Introduction

Fungaemia is an important cause of morbidity and mortality closely associated with high healthcare costs in hospitalized

patients. Although *Candida albicans* is still the leading cause of fungaemia worldwide, there are important geographical differences in species distribution and patterns of *in vitro* susceptibilities to antifungal agents.^{1,2} Thus, performing epidemiological

surveillance studies is important to evaluate potential changes in species distribution and antimicrobial susceptibility, and also to assess the potential impact of new antifungal agents on therapy. In the present study, the main epidemiological characteristics of 1357 fungaemia episodes and the *in vitro* profiles of the susceptibility of isolates to nine antifungal agents are described. Furthermore, we have evaluated the influence of the new species-specific clinical breakpoints (SSCBPs) on resistance rates. To our knowledge, this is the first study reporting the incidence for the newly defined species *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*.

Patients and methods

Study design

The FUNGEMYCA survey was a prospective, sequential study carried out over a 13 month period, from 1 January 2009 to 31 January 2010, in 44 Spanish tertiary institutions. The distribution of participant hospitals according to the number of beds was >1000 beds (41%), between 600 and 1000 beds (31.8%) and <600 (27.2%). All participating hospitals collected and identified the isolates from blood cultures and completed demographic and clinical questionnaires.

Definitions

A fungaemia episode was defined as the isolation of fungi from blood cultures in a patient with temporally related clinical signs and symptoms. Outpatient-acquired fungaemia was considered when the fungal aetiological agent was isolated in blood in the first 48 h after hospital admission. Age groups were neonates (<30 days of age), children (1 month–15 years old), adults (16–64 years old) and the elderly (>64 years old).

Identification and antifungal susceptibility study

All isolates were identified and their susceptibility to antifungal agents tested at the participating institutions and stored as suspensions in sterile water at room temperature. Antifungal susceptibility testing to nine agents was performed by the microdilution colorimetric Sensititre YeastOne® SYO-09 panel (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH, USA). On the basis of the good correlation between SensititreYeastOne® and CLSI results,³ CLSI clinical breakpoints and the recently published SSCBPs and epidemiological cut-off values (ECVs) were applied.^{4–9} For posaconazole and amphotericin B, isolates inhibited by >1 mg/L were considered resistant. Quality controls were performed in each centre using *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida krusei* ATCC 6258.

Molecular identification of the *C. parapsilosis* complex

The identities of *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* isolates were confirmed in a reference laboratory as described by Miranda-Zapico et al.¹⁰ Furthermore, the identities of these species were confirmed by DNA amplifying and further sequencing of ITS1 and ITS4 regions of rRNA genes.

Molecular identification of the *Candida glabrata* complex

The molecular re-identification of all *C. glabrata sensu lato* isolates into the species *C. glabrata sensu stricto*, *C. nivariensis* and *C. bracarensis* was performed in a reference laboratory as previously described by Alcoba-Flórez et al.¹¹

Statistical analyses

Incidences for each participating centre were calculated as the number of fungaemia episodes per 1000 admissions. Data were analysed with SPSS 10.0.7 for statistics (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Continuous variables were compared with Student's *t*-test and categorical variables with the χ^2 or Fisher's exact test. Comparison of antifungal susceptibility was carried out with \log_2 MIC. Differences in antifungal susceptibility patterns among species and age groups were evaluated using non-parametric Kruskal–Wallis analysis of variance followed by a Mann–Whitney *U*-test with Bonferroni correction for multiples comparison. A *P* value <0.05 was considered significant.

Results and discussion

Fungaemia incidence varies depending on hospital characteristics, geographical area and denominator used, which makes comparisons among studies difficult. However, an increase in incidence is being observed worldwide. In our study, the overall incidence (0.92 episodes/1000 admissions, range 0.18–2.2) is similar to recent studies in Europe (0.41–1.09 episodes/1000 admissions),¹² but lower than that observed in Brazil (2.49 episodes/1000 admissions).¹³ Table 1 shows the incidence of episodes caused by the six most common species. Of the total of 1357 episodes of fungaemia reported in the current survey, of note is that *C. orthopsilosis* was the fifth most common cause of fungaemia (0.020). More fungaemia occurred amongst patients hospitalized in general wards (65.2%) than in those from intensive care units (ICUs) and among elderly patients (46.4%). The main yeasts isolated were *C. albicans* (44.66%), *C. parapsilosis* (26.58%), *C. glabrata* (11.47%), *Candida tropicalis* (8.21%), *C. orthopsilosis* (2.18%), *C. krusei* (1.96%), *Candida lusitanae* (0.94%), *Cryptococcus neoformans* (0.73%), *Candida guilliermondii* (0.65%), *Candida famata* (0.44%), *Trichosporon asahii* (0.36%), *Candida dubliniensis* (0.29%), *C. metapsilosis* (0.29%), *Rhodotorula glutinis* (0.29%), *Rhodotorula mucilaginosa* (0.22%), *Candida kefyr* (0.15%), *Candida pseudotropicalis* (0.07%), *Blastoschizomyces capitatus* (0.07%), *Saccharomyces cerevisiae* (0.07%), *Trichosporon mucoides* (0.07%) and *Debaryomyces etchellsii* (*Pichia etchellsii*) (0.07%). Neither *C. nivariensis* nor *C. bracarensis* was isolated. In agreement with Pfaller et al.¹⁴ and our previous national survey,¹⁵ the global rank order of species isolated in ICU and non-ICU settings was the same. Of note, *C. glabrata* was the third most common species in Spain, prevailing over *C. tropicalis*. The rank order of species in the ICU was characteristic of each institution, possibly being related to the different antifungal practices (prophylaxis and/or treatment) and to the patient management in each of these settings.

Recently *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* have been described as causes of candidaemia in Spain,¹⁰ but the incidence of these species is not well known. Notably, in our survey, *C. orthopsilosis* was the fifth most common cause of candidaemia, with 0.020 episodes per 1000 admissions being caused by this species. *C. metapsilosis* fungaemia was anecdotal: four isolates (0.3%, 0.003 episodes per 1000 admissions). However, the incidence of fungaemia by *C. parapsilosis* was 11 and 74 times higher than that by *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*, respectively.

Mixed fungaemia has been a matter of concern for its potentially poorer prognosis. However, in our study mixed fungaemia was uncommon, as only 20 episodes (1.5%) were caused by two or more fungal species and were reported mainly in ICU settings (50%), confirming the report of Jensen et al.¹⁶ for a single

Table 1. Demographic characteristics of patients with fungaemia and species distribution

	Location at time of fungaemia, no. (%)		Total, no. (%)	Incidence per 1000 admissions
	ICU	non-ICU		
<i>C. albicans</i>	230 (48.0)	385 (42.9)	615 (44.7)	0.412
<i>C. parapsilosis</i>	127 (26.5)	239 (26.6)	366 (26.6)	0.222
<i>C. glabrata</i>	45 (9.4)	113 (12.6)	158 (11.5)	0.107
<i>C. tropicalis</i>	41 (8.6)	72 (8.0)	113 (8.2)	0.076
<i>C. orthopsilosis</i>	7 (1.5)	23 (2.6)	30 (2.2)	0.020
<i>C. krusei</i>	6 (1.3)	21 (2.3)	27 (2.0)	0.018
Other <i>Candida</i> spp.	13 (2.7)	26 (2.9)	39 (2.8)	0.025
Other yeasts	10 (2.1)	16 (1.8)	26 (1.9)	0.019
<i>Fusarium</i> spp.	0	3 (0.3)	3 (0.2)	0.002
Total	479 (34.8)	898 (65.2)	1377	0.925

Table 2. *In vitro* susceptibility of 1377 fungaemia isolates to nine antifungal agents

Species (no. of isolates tested)	Drug	MIC range (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	Percentage of susceptible isolates M27-S3	Percentage of resistant or non-susceptible isolates according to	
						M27-S3	SSCBPs
<i>C. albicans</i> (615)	AND	0.016–8	0.03	0.12	99.8	0.2	0.8
	CAS	0.008–1	0.03	0.12	100	0	0.2
	MCF	0.008–8	0.016	0.03	99.7	0.4	1.1
	FLC	0.06–256	0.5	1	98.4	1.5	2.6
	ITC	0.016–16	0.06	0.12	93.3	2.1	ND
	VOR	0.008–8	0.008	0.016	98.3	1.6	1.6
	POS	0.008–8	0.03	0.12	98	1.9	10.1 ^a
	AMB	0.12–1	0.25	0.5	100	0	ND
	5FC	0.06–64	0.06	0.5	98.8	0.7	ND
<i>C. parapsilosis</i> (366)	AND	0.016–8	1	2	98.1	1.6	0.5
	CAS	0.008–8	0.5	1	99.7	0.3	0.3
	MCF	0.008–8	1	2	97.4	2.2	1.1
	FLC	0.06–32	1	2	98.1	0	4.1
	ITC	0.016–1	0.06	0.12	90.7	0.3	ND
	VOR	0.008–1	0.016	0.06	100	0	0.5
	POS	0.008–2	0.03	0.12	99.7	0.3	0.8 ^a
	AMB	0.12–2	0.25	0.5	99.6	0.3	ND
	5FC	0.06–8	0.06	0.25	99.7	0	ND
<i>C. glabrata</i> (158)	AND	0.016–4	0.03	0.06	99.4	0.6	2.5
	CAS	0.008–1	0.06	0.12	100	0	1.9
	MCF	0.008–8	0.016	0.03	98.7	1.2	3.2
	FLC	0.12–256	8	16	65.8	6.3	6.3
	ITC	0.016–16	0.5	1	19.4	24.1	ND
	VOR	0.008–8	0.12	0.5	95.5	1.2	8.9 ^a
	POS	0.008–8	1	2	85.7	14.5	5.7 ^a
	AMB	0.12–2	0.5	1	99.3	0.6	ND
	5FC	0.06–8	0.06	0.06	99.3	0	ND
<i>C. tropicalis</i> (113)	AND	0.016–8	0.06	0.25	99.1	0.9	0.9
	CAS	0.008–0.25	0.06	0.12	100	0	0

Continued

Table 2. Continued

Species (no. of isolates tested)	Drug	MIC range (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	Percentage of susceptible isolates M27-S3	Percentage of resistant or non-susceptible isolates according to	
						M27-S3	SSCBPs
<i>C. orthopsilosis</i> (30)	MCF	0.008–8	0.03	0.06	99.1	0.9	0.9
	FLC	0.12–256	1	4	94.7	5.3	9.9
	ITC	0.016–16	0.25	1	49.6	10.6	ND
	VOR	0.008–8	0.06	0.5	93.8	5.3	6.2
	POS	0.008–8	0.12	0.5	92.9	7.1	49.6 ^a
	AMB	0.12–2	0.5	1	99.1	0.9	ND
	5FC	0.06–32	0.06	0.12	99.1	0.9	ND
	AND	0.12–2	0.5	1	100	0	0 ^a
	CAS	0.12–1	0.25	0.5	100	0	10 ^a
	MCF	0.12–2	0.5	1	100	0	6 ^a
	FLC	0.25–16	0.5	2	100	0	3 ^a
	ITC	0.016–0.25	0.12	0.25	100	0	ND
	VOR	0.008–0.25	0.16	0.03	100	0	3 ^a
	POS	0.016–0.25	0.06	0.12	100	0	0 ^a
AMB	0.12–0.5	0.25	0.5	100	0	ND	
5FC	0.06–4	0.06	0.12	100	0	ND	
<i>C. krusei</i> (27)	AND	0.016–8	0.06	0.12	96.2	3.7	3.7
	CAS	0.03–8	0.25	0.5	92.3	7.4	7.4
	MCF	0.03–8	0.12	0.12	96.2	3.7	7.4
	FLC	4–64	32	64	11.5	—	—
	ITC	0.016–4	0.25	0.5	15.4	81.5	ND
	VOR	0.03–2	0.25	0.25	96.2	0	3.7
	POS	0.016–1	0.25	0.5	100	0	3.7 ^a
	AMB	0.12–1	0.5	1	100	0	ND
	5FC	0.06–16	8	16	46.2	0	ND
	AND	0.03–1	0.12	0.5	100	0	0 ^a
<i>C. lusitanae</i> (13)	CAS	0.06–1	0.12	0.5	100	0	7.7 ^a
	MCF	0.008–0.5	0.06	0.25	100	0	0 ^a
	FLC	0.12–2	0.5	1	100	0	0 ^a
	ITC	0.016–0.25	0.12	0.12	92.3	0	ND
	VOR	0.008–0.03	0.008	0.016	100	0	0 ^a
	POS	0.016–0.12	0.03	0.06	100	0	0 ^a
	AMB	0.12–0.5	0.12	0.25	100	0	ND
	5FC	0.06–0.25	0.06	0.06	100	0	ND
	AND	0.03–2	0.5	2	100	0	ND
Other <i>Candida</i> ^b (26)	CAS	0.016–8	0.25	1	92.0	8.0	ND
	MCF	0.008–4	0.5	1	96	4.0	ND
	FLC	0.12–16	1	8	95.8	0	ND
	ITC	0.03–1	0.12	0.5	54.2	4.2	ND
	VOR	0.008–0.5	0.03	0.12	100	0	ND
	POS	0.008–0.5	0.12	0.5	100	0	ND
	AMB	0.12–1	0.25	0.5	100	0	ND
	5FC	0.06–4	0.06	0.25	100	0	ND
	AND	0.016–8	0.06	2	99.2	0.8	ND
	CAS	0.008–8	0.06	0.5	99.6	0.4	ND
MCF	0.008–8	0.016	1	98.9	1.1	ND	

Continued

Table 2. Continued

Species (no. of isolates tested)	Drug	MIC range (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	Percentage of susceptible isolates M27-S3	Percentage of resistant or non-susceptible isolates according to	
						M27-S3	SSCBPs
	FLC	0.06–256	0.5	8	92.3	2.9	ND
	ITC	0.016–16	0.12	0.5	48.5	5.1	ND
	VOR	0.008–8	0.008	0.25	98.1	1.4	ND
	POS	0.008–8	0.03	0.5	96.7	3.3	ND
	AMB	0.12–2	0.25	0.5	99.8	0.2	ND
	5FC	0.06–64	0.06	0.25	98.1	0.4	ND
<i>C. neoformans</i> (10)	AND	8–>8	8	>8	0	100	ND
	CAS	8–>8	8	>8	0	100	ND
	MCF	8–>8	8	>8	0	100	ND
	FLC	0.5–8	4	8	100	0	0 ^a
	ITC	0.016–0.12	0.06	0.12	100	0	ND
	VOR	0.008–0.06	0.03	0.06	100	0	0 ^a
	POS	0.016–0.25	0.12	0.25	100	0	0 ^a
	AMB	0.12–0.5	0.12	0.5	100	0	ND
	5FC	0.5–4	4	4	100	0	ND
Other yeasts ^c (16)	AND	0.016–>8	8	>8	12.5	87.5	ND
	CAS	0.06–>8	8	>8	12.5	87.5	ND
	MCF	0.03–>8	8	>8	12.5	87.5	ND
	FLC	1–256	8	256	56.3	37.5	ND
	ITC	0.003–16	0.25	4	43.8	37.6	ND
	VOR	0.008–8	0.06	4	62.5	18.8	ND
	POS	0.008–8	0.25	8	75	25	ND
	AMB	0.12–1	0.5	1	100	0	ND
	5FC	0.06–32	0.12	16	87.5	6.3	ND
Overall yeasts (1374)	AND	0.016–>8	0.06	2	97.6	2.4	ND
	CAS	0.008–>8	0.06	0.5	98	2.0	ND
	MCF	0.008–>8	0.03	1	97.3	2.7	ND
	FLC	0.06–256	0.5	8	91.9	3.3	ND
	ITC	0.016–16	0.12	0.5	77.6	5.4	ND
	VOR	0.008–4	0.016	0.25	97.7	1.6	ND
	POS	0.008–8	0.06	0.5	96.5	3.5	ND
	AMB	0.12–2	0.25	0.5	99.8	0.2	ND
5FC	0.06–64	0.06	0.25	98	0.5	ND	
<i>Fusarium</i> spp. (3)	AND	0.015–8	0.12	—	ND	ND	ND
	CAS	0.008–8	0.12	—	ND	ND	ND
	MCF	0.008–8	0.25	—	ND	ND	ND
	FLC	0.06–256	0.5	—	ND	ND	ND
	ITC	0.016–16	0.06	—	ND	ND	ND
	VOR	0.008–8	0.008	—	ND	ND	ND
	POS	0.008–8	0.03	—	ND	ND	ND
	AMB	0.12–2	0.25	—	ND	ND	ND
	5FC	0.06–32	0.06	—	ND	ND	ND

AND, anidulafungin; CAS, caspofungin; MCF, micafungin; FLC, fluconazole; ITC, itraconazole; VOR, voriconazole; POS, posaconazole; AMB, amphotericin B; 5FC, flucytosine; ND, not defined.

^aIsolates above ECV.

^bNine isolates of *C. guilliermondii*, six of *C. famata*, four each of *C. dubliniensis* and *C. metapsilosis*, two of *C. kefyr* and one *C. pseudotropicalis*.

^cFive isolates of *T. asahii*, four of *R. glutinis*, three of *R. mucilaginosa*, and one isolate each of *B. capitatus*, *S. cerevisiae*, *T. mucoides* and *D. etchellsii*.

institution. Finally, there were three episodes caused by *Fusarium solani*, *Fusarium verticilloides* and *Fusarium* sp.

Fungaemia aetiology varied according to age, gender, hospitalization ward or underlying conditions of the patients. *C. albicans* was the most prevalent species in neonates (53.6%), adults (44.8%) and elderly patients (47.3%), while *C. parapsilosis* was predominant in children (48.9%), with statistically significant differences between both species ($P < 0.05$).

Table 2 summarizes the results of *in vitro* susceptibility, applying both current and new CLSI SSCBPs. Overall, 88.9% of yeast isolates were susceptible to the nine antifungal agents tested. Although there has been wide use of fluconazole in the last decade in Spain, the susceptibility rate to this agent continues to be very high (91.9%). These findings have also been reported by other authors.¹⁴ More than 95% of *C. glabrata* and *C. krusei* isolates were highly susceptible to anidulafungin, micafungin and voriconazole. Conversely, itraconazole was the least active drug, 5.4% of yeast isolates being resistant and 77.6% susceptible. Important resistance rates were only observed in *C. glabrata* for itraconazole (24.1%) and posaconazole (14.5%), and in *C. krusei* for itraconazole (81.5%).

Resistance rates changed moderately when applying the new SSCBPs, and the most remarkable increases were observed in *C. parapsilosis* for fluconazole (from 0% to 4.1%), and in *C. krusei* for voriconazole (from 0% to 3.7%). Echinocandin resistance increased between 0 and 4.1 times depending on the fungal species and the specific drug, *C. glabrata* being the most affected species.

For the four most common species, the percentage of isolates above the posaconazole ECV ranged from 0.8% for *C. parapsilosis* to 49.6% for *C. tropicalis*. While the percentage of isolates inhibited by >1 mg/L posaconazole ranged from 0.3% for *C. parapsilosis* to 14.5% for *C. glabrata*, this latter species was the only one where the percentage of non-wild-type isolates diminished with the application of the ECV.

Amphotericin B and flucytosine were the agents with the lowest overall resistance rates (0.2% and 0.5%, respectively). Thus the overall resistance rates to antifungal agents in our study were very low, being even lower in ICU settings.

Excluding those intrinsically resistant species, echinocandins show a broad antifungal activity. Moreover, resistance rates ($\leq 1.1\%$) varied slightly when applying the revised SSCBPs for most species. However, increased resistance rates were observed in *C. glabrata* (from 1.9% to 3.2%) and *C. krusei* (from 3.7% to 7.4%), rates similar to those reported by other authors.¹⁴

In summary, we present the largest multicentre fungaemia study conducted in Spain and provide the incidence of the cryptic species included in the *C. parapsilosis* and *C. glabrata* complexes and the *in vitro* susceptibility of blood isolates to nine of the currently most used systemic antifungal agents. Furthermore, we have determined the repercussions of the recent ECVs and SSCBPs on resistance rates. The large size of this study minimizes its clinical limitations, thus providing valuable information for clinicians before establishing empirical treatment in patients with fungaemia.

Acknowledgements

Besides the authors, the FUNGEMYCA Study Group also included: Consuelo Miranda (Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada);

Isolina Campos-Herrero (Hospital Universitario Dr. Negrín, Las Palmas); David Navarro (Hospital Clínico Universitario, Valencia); Isabel Iglesias (Complejo Hospitalario, Vigo); Carmen Rubio (Hospital Clínico Universitario, Zaragoza); Bárbara Gomila (Hospital General, Castellón); Anabel Suarez (Hospital Virgen Macarena); Ana María García-Tapia (Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz); David Velasco (Complejo Hospitalario A Coruña, Coruña); Inmaculada García (Hospital Clínico Universitario, Salamanca); Luis Torroba (Hospital Universitario Virgen del Camino, Pamplona); Ferran Sánchez-Reus (Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona); Carmen Pazos (Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres); Juan J. Camarena (Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia); María Julia Echeverría (Hospital Donostia, San Sebastián); Isabel Fernández-Natal (Hospital General, León); Estrella Martín-Mazuelos (Hospital Universitario Nuestra Señora de Valme, Sevilla); Antonio Rezusta (Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza); Amelia Gómez-Nieto (Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid); José Martínez-Alarcón (Hospital General, Ciudad Real); Dionisia Fontanals (Corporació Sanitari Parc Tauli, Sabadell); Buenaventura Buendía (Hospital Universitario La Princesa, Madrid); Josefina Ayats (Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat); Miguel Ángel Bratos (Hospital Clínico Universitario, Valladolid); María Álvarez-Fernández (Hospital Central de Asturias, Oviedo); Gloria Royo (Hospital General Universitario, Elche); Guillermo Ezpeleta (Hospital Basurto, Bilbao); Inmaculada Ramírez (Hospital Virgen de la Concha, Zamora); Remedios Guna (Hospital General Universitario, Valencia); and Juliana Esperalba (Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda).

Funding

The FUNGEMYCA Study was supported financially by an unrestricted grant from Astellas Pharma S.A.

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Tortorano AM, Pemán 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**: 317–22.
- 2 Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA et al. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 396–9.
- 3 Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A et al. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for *in vitro* detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 1782–6.
- 4 Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ et al. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat* 2010; **13**: 180–95.
- 5 Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D et al. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical,

- and microbiological data to arrive at specie-specific interpretative criteria. *Drug Resist Updat* 2011; **14**: 164–76.
- 6** Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC *et al.* Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **70**: 330–43.
- 7** Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ *et al.* Triazole and echinocandin wild-type MIC distributions with epidemiological cutoff values for six uncommon species of *Candida*. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 3800–4.
- 8** Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ *et al.* Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for posaconazole and voriconazole and *Candida* spp. as determined by 24-hour CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 630–7.
- 9** Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Third Informational Supplement M27-S3*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- 10** Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new crypto-species inside the species-complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2315–22.
- 11** Alcoba-Flórez J, Arévalo MP, González-Paredes FJ *et al.* PCR protocol for specific identification of *Candida nivariensis*, a recently described pathogenic yeast. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 6194–6.
- 12** Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ *et al.* National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 325–34.
- 13** Colombo AL, Nucci M, Park BJ *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2816–23.
- 14** Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ *et al.* *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in intensive care unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Int J Antimicrob Agents* 2011; **38**: 65–9.
- 15** Pemán J, Cantón E, Gobernado M. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; **24**: 23–30.
- 16** Jensen J, Muñoz P, Guinea J *et al.* Mixed fungemia: incidence, risk factors, and mortality in a general hospital. *Clin Infect Dis* 2007; **44**: e109–14.

Rapid identification of yeasts from positive blood culture bottles by pyrosequencing

I. Quiles-Melero · J. García-Rodríguez ·
M. P. Romero-Gómez · P. Gómez-Sánchez ·
J. Mingorance

Received: 6 May 2010 / Accepted: 10 August 2010 / Published online: 28 August 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract We have developed a rapid protocol for the identification of *Candida* species from positive blood cultures by combining a simple method for nucleic acid extraction and preparation using microbial storage cardboards with polymerase chain reaction (PCR) and pyrosequencing of a small region of the 18 S rRNA gene. The protocol is robust and easy to implement and can be performed in 4 h. The method was tested against a collection of clinical blood cultures. Agreement of sequence identifications with standard microbiological methods was 100%.

Introduction

Bloodstream fungal infections are a significant and increasing cause of morbidity and mortality in immunocompromised and critically ill patients [1, 2]. The nature of the infection depends on the underlying disease, and the epidemiology of invasive infections is changing in parallel with advances in clinical practices that transform the population at risk. The most frequent agents of invasive fungal infection are *Candida* species, and, among them, *C. albicans* is responsible for the more than half of the episodes, while *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. glabrata* make up most of the remaining fraction [3, 4]. Candidaemia is often associated with surgical intervention, solid organ transplantation, solid tumour or haematological

malignancies, and intensive care treatment [5, 6]. The early detection and initiation of antifungal therapy is crucial for reducing the mortality [7], and given the high correlation between species and antifungal susceptibility among the pathogenic *Candida* [1, 6], the rapid identification of *Candida* isolates at the species level would be useful for starting an appropriate treatment or correcting an empirical one.

The gold standard for diagnosing candidaemia is the blood culture of *Candida* sp. The most efficient procedures use automated systems for incubation and monitoring of growth, but even these lack sensitivity and usually take two to five days of incubation until growth can be detected. Once isolated, the identification at the species level with conventional methods takes another 24–48 h. Thus, there is a need for methods to speed up the detection and identification of fungi in blood and in cultures, and several rapid techniques have been developed. Fungal-specific polymerase chain reaction (PCR) assays, mostly targeting regions of the rRNA genes or the internal transcribed spacer regions, have been evaluated for use with cultures or with serum or blood samples from various patient groups [8, 9]. Most of these methods are developed in-house and there are few data on their effectiveness in clinical practice.

Pyrosequencing is a DNA sequencing method that can be easily adapted for routine use in the clinical microbiology laboratory, and there are several recent reports on the successful use of pyrosequencing for the identification of yeasts [10–12]. The objective of this study was to develop and evaluate a rapid method for the identification of yeast species from positive blood cultures using pyrosequencing in combination with a very simple sample preparation method.

Positive blood cultures with fungal growth obtained in our hospital during 2009 were studied. Two systems for

I. Quiles-Melero · J. García-Rodríguez · M. P. Romero-Gómez ·
P. Gómez-Sánchez · J. Mingorance (✉)
Servicio de Microbiología,
Hospital Universitario La Paz—IdiPAZ,
Paseo de La Castellana, 261,
Madrid 28046, Spain
e-mail: jmingorancec.hulp@salud.madrid.org

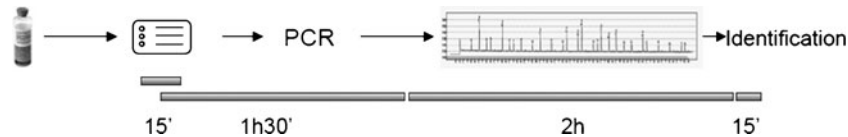


Fig. 1 Rapid method for the identification of *Candida* spp. from clinical blood cultures. Samples from positive bottles are analysed by Calcofluor white staining. Fifteen μ l from bottles with fungal growth are applied directly to Genocard[®] storage cardboards. A small disc is punched out from the dried card and put directly into the polymerase

chain reaction (PCR) reaction mix. After amplification, the PCR product is used directly for standard pyrosequencing in 96-well format plates. The sequences obtained are searched against a local database to identify the yeast species

automated blood culture monitoring were used: BacT/Alert 3D (bioMérieux, Inc., Durham, NC, USA) and the VersaTREK system (TREK Diagnostic Systems, Inc., Cleveland, OH, USA). Positive blood culture bottles were analysed by Gram and Calcofluor white staining in order to select samples with yeast growth. All of the isolates were identified by visual inspection of the morphology of colonies grown on chromogenic agar (Tec-Laim S.A., Madrid, Spain) and by the VITEK system (bioMérieux) or an auxanogram using API 20 C Aux (bioMérieux).

For PCR and sequence analysis, a 15- μ l volume from the blood culture bottles were applied to Genocard[®] storage cardboards (Hain Lifescience, Nehren, Germany) and left to dry at room temperature for 15 min. Sample discs (1 mm diameter, approximately 5 μ l in volume) were then punched out and added directly to the PCR reaction tubes with no pre-treatment. Amplification reactions were performed in a 45 μ l volume (plus the sample disc volume) using the Phusion[®] Blood Direct PCR Kit (Finnzymes Oy, Espoo, Finland). PCR primers targeting an approximately 500-bp region of the 18 S rRNA gene were [11]: bio-funF (5'-Biotin-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3') and funR (5'-CCGATCCCTAGTCGGCAT-3'). The thermal cycling parameters were: initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 20 s, annealing at 54°C for 20 s and extension at 72°C for 40 s, and a final extension step at 70°C for 5 min.

The amplification products were subjected to pyrosequencing analysis as described earlier [11]. The sequencing primers used were funS [11] (5'-YTCAMAGTAAAAGTCCTGG-3') or funS2 (5'-TCAAAGTAAAAGTCCTGGTTC-3'). Pyrosequencing was done with a Pyromark ID system following the manufacturer's instructions (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The sequencing reactions were done using 40 μ l of the PCR reactions and 20 cycles of dispensation of the four nucleotides (80 nucleotide dispensations).

For species identification, the sequences were searched against local databases using IdentiFire software (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Two different databases were tested: one containing 40 representative sequences from clinically relevant fungi downloaded manually from GenBank and another one containing the *Candida* sequences from the previous database and a few additional sequences downloaded from the SILVA rRNA database project (<http://www.arb-silva.de/>) [13]. Sequences shorter than 30 bp were discarded. Sequences with poor quality and similarity lower than 85% to the database sequences were discarded. In order to test the reproducibility of direct pyrosequencing from blood cultures, samples from six bottles were applied to cards and sequenced several times.

A total of 48 positive blood cultures that had been shown to contain 47 yeast and one filamentous fungus upon Calcofluor white staining were selected. Identification by pyrosequencing could be performed within 4 h as follows: 15 min for sample preparation; 1 h and 30 min for PCR reaction; and 2 h and 15 min for pyrosequencing, including sample preparation, sequencing reaction and the analysis of results (Fig. 1). The species identified are shown in Table 1. For a total of 47 samples, a readable sequence could be obtained with the funS sequencing primer [11]. The only exception was *C. krusei*, which has two mismatches near the 5'-side of the sequencing primer that might decrease the

Table 1 Sequences obtained by pyrosequencing with primers funS or funS2*

Samples	Culture	Pyrosequencing	Sequence
24	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	TTCGCCATAAATGGCTACCCAGAAGGAAAGGCTCGGCTGGT
17	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	TTCGCCAAAAAGGCTAGCCAGAAGGAAAGGCTCGGCTGGGT
3	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	TTCGCCAAAAAGGCTAGCCAGAAGGAAAGGCTCGGTTGGGTC
1	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	TTCGCCGCCAAGCCACAAGGACTTGGGGTTAGCCAGAAGGA
1	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	TTCGCCATAAATGGCTAGCCAGAAGGAAAGGCTCGGCTGGG
1	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i> *	GCCCGAGGGCTAGCCAGAAGGAAAGACCCGGCCGCAACAGTG
1	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	TTCCCCCACAGCCAGTGAAGGCCATGAGGTTCCCCAGAAG

efficiency of hybridisation. To work out this problem, a new oligonucleotide, funS2, was designed displacing the primer sequence three nucleotides towards the target region. Using this sequencing primer, all of the species could be efficiently identified from cardboards. Repeated sequencing from several bottles always gave consistent results, and both PCR amplification and pyrosequencing could be successfully done, even from cards that had been stored for several weeks at room temperature. Importantly, the method worked correctly with blood culture bottles containing activated charcoal and sodium polyethanesulfonate (BacT/Alert FA and FN). Blood culture bottles containing charcoal or other resins that adsorb antibiotics and other growth inhibitors are widely used due to the improvement in the recovery of microorganisms, but they pose several problems when trying to purify or amplify nucleic acids because fungal cells are difficult to separate from charcoal, and some compounds (e.g. polyethanesulfonate) inhibit the PCR reaction. One bottle had a mixed culture of yeast with a coagulase-negative *Staphylococcus*, but this did not interfere with the sequencing of the fungal gene. There were no mixed yeast cultures. Indeed, blood cultures positive for fungi usually contain a single species [14].

Searching the local databases could unambiguously identify all of the samples. The average read length was 48 bp (range 41–56), and the percent similarity with the database top match was 91% (range 80–100). All of the mismatches could be attributed to errors in counting the number of nucleotides in homopolymeric runs or to “echo” peaks produced by the incomplete filling of long homopolymeric runs in a small fraction of the molecules; this error was frequently found in *C. parapsilosis* sequences, as these have a run of five adenines near the beginning of the sequence. These mismatches could be corrected manually, but manual editing did not change the identification in any case. All of the sequence identifications were confirmed by the routine microbiological methods. It is noteworthy that unambiguous identification was obtained with a single short read (40 to 50 bp long) when sequences were searched against any of the two local databases containing the clinically relevant species. Although *C. albicans* and *C. dubliniensis* differ in a single nucleotide in the sequenced region, and *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* differ in two nucleotides, one of them in an adenine homopolymeric run, the quality of the sequences obtained was sufficient to differentiate isolates from these species.

The method takes about 4 h to complete, and is quite simple to perform, with about 1 h of hands-on time, so that it is relatively easy to fit it into a standard working shift. Other protocols have been developed previously to identify yeast species directly from blood culture bottles, but they use expensive probes or relatively complex nucleic acid

extraction methods [15, 16]. The amplification of DNA from storage cards used for blood samples had been successfully achieved with bacteria [17], but it has been difficult to obtain reproducible results with fungal samples, even if several washing steps were included in the protocol. The use of a robust polymerase, which is highly processive and resistant to several inhibitors, has made it possible to obtain reproducible results without previous treatment of the sample discs from blood culture bottles with and without charcoal. The minimisation of the sample preparation procedure in our protocol, with elimination of the nucleic acid extraction step, greatly simplifies the method and decreases the cost, facilitating its incorporation into a routine laboratory workflow. The method might be introduced into the routine diagnostics of invasive fungal infections to reduce by up to two days the time necessary to start or correct the empirical antifungal therapy, and this might be of great help to improve patient outcome and reduce treatment costs.

Acknowledgements J. Mingorance was the recipient of a Ramón y Cajal fellowship financed by the European Social Fund and the Ministerio de Ciencia e Innovación.

References

- Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM (2009) Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 48:1965–1703
- Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, Pfaller M, Chang C, Webster K, Marr K (2009) Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis* 48:265–273
- Gürcüoğlu E, Ener B, Akalin H, Sinirtaş M, Evcı C, Akçağlar S, Yılmaz E, Heper Y (2010) Epidemiology of nosocomial candidaemia in a university hospital: a 12-year study. *Epidemiol Infect* 138:1328–1335
- Bassetti M, Ansaldi F, Nicolini L, Malfatto E, Molinari MP, Mussap M, Rebesco B, Bobbio Pallavicini F, Icardi G, Viscoli C (2009) Incidence of candidaemia and relationship with fluconazole use in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 64:625–629
- Lass-Flörl C (2009) The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 52:197–205
- Lewis RE (2009) Overview of the changing epidemiology of candidemia. *Curr Med Res Opin* 25:1732–1740
- Patel GP, Simon D, Scheetz M, Crank CW, Lodise T, Patel N (2009) The effect of time to antifungal therapy on mortality in Candidemia associated septic shock. *Am J Ther* 16:508–511
- Li YL, Leaw SN, Chen JH, Chang HC, Chang TC (2003) Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22:693–696

9. Luo G, Mitchell TG (2002) Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2860–2865
10. Boyanton BL Jr, Luna RA, Fasciano LR, Menne KG, Versalovic J (2008) DNA pyrosequencing-based identification of pathogenic *Candida* species by using the internal transcribed spacer 2 region. *Arch Pathol Lab Med* 132:667–674
11. Gharizadeh B, Norberg E, Löffler J, Jalal S, Tollemar J, Einsele H, Klingspor L, Nyrén P (2004) Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology. *Mycoses* 47:29–33
12. Montero CI, Shea YR, Jones PA, Harrington SM, Tooke NE, Witebsky FG, Murray PR (2008) Evaluation of Pyrosequencing technology for the identification of clinically relevant non-dematiaceous yeasts and related species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:821–830
13. Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucl Acids Res* 35:7188–7196
14. Jensen J, Muñoz P, Guinea J, Rodríguez-Crèixems M, Peláez T, Bouza E (2007) Mixed fungemia: incidence, risk factors, and mortality in a general hospital. *Clin Infect Dis* 44:e109–e114
15. Gherna M, Merz WG (2009) Identification of *Candida albicans* and *Candida glabrata* within 1.5 hours directly from positive blood culture bottles with a shortened peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization protocol. *J Clin Microbiol* 47:247–248
16. Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, Cookson BT (2003) Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 41:5660–5664
17. Eigner U, Weizenegger M, Fahr AM, Witte W (2005) Evaluation of a rapid direct assay for identification of bacteria and the *mecA* and *van* genes from positive-testing blood cultures. *J Clin Microbiol* 43:5256–5262

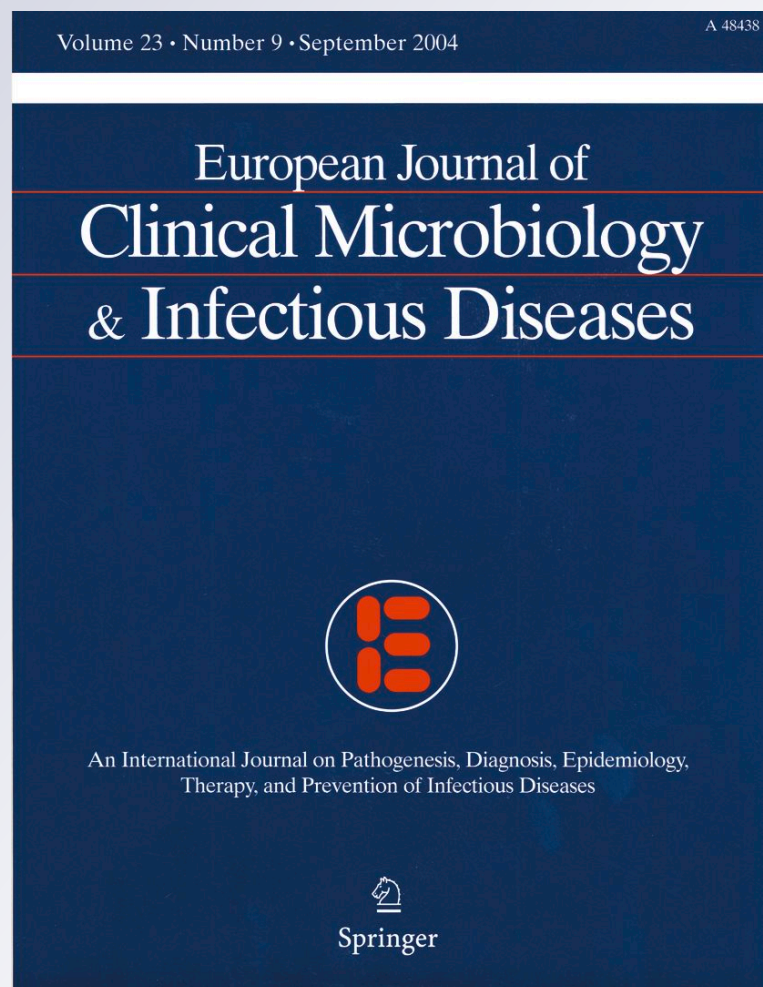
Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of Candida parapsilosis, C. orthopsilosis and C. metapsilosis

I. Quiles-Melero, J. García-Rodríguez, A. Gómez-López & J. Mingorance

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

ISSN 0934-9723
Volume 31
Number 1

Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2012)
31:67-71
DOI 10.1007/s10096-011-1277-z



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*

I. Quiles-Melero · J. García-Rodríguez ·
A. Gómez-López · J. Mingorance

Received: 3 March 2011 / Accepted: 13 April 2011 / Published online: 6 May 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract We have evaluated matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for the rapid identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. A total of 103 isolates, including reference strains and clinical isolates, were identified by pyrosequencing of the *ITS1* region and then assay by MALDI-TOF mass spectrometry. Concordance between the two methods was 100%, showing that MALDI-TOF may be useful as a rapid and reliable method for discrimination of species within the *C. parapsilosis* group.

Introduction

Candida parapsilosis is an opportunistic pathogen that accounts for a significant proportion of nosocomial fungaemia outbreaks. It is a normal inhabitant of the skin, and has been isolated from the hands of healthcare workers who install and maintain catheters and other medical devices, suggesting a potential route for transmission [1–3]. It is able to form biofilms on prosthetic materials leading to foreign body infections [4] and intravenous line colonisation. It is generally considered a

low-virulence organism, but has been reported to cause peritonitis, infectious arthritis, endophthalmitis and prosthetic valve endocarditis [5].

Isolates of *C. parapsilosis* had been reported to be phenotypically indistinguishable, but genetically heterogeneous, eventually leading to the suggestion that *C. parapsilosis sensu lato* could be divided into three groups on the basis of several criteria, including analysis of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) [5], isoenzyme electrophoresis [6], sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region of the rRNA gene cluster [6] or the DNA topoisomerase II gene [7] and analysis of mitochondrial telomeres [8]. In 2005 Tavanti et al. proposed that these three groups should be classified as three new species based on sequences from four separate genes, RAPD, and *ITS1* sequencing: *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* [9]. In 2009 Borman et al. described the use of pyrosequencing of 20 nucleotides from *ITS2* to identify the three species [10]. Following their initial description, it was assumed that accurate discrimination between *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis* could be important for epidemiological surveys, but recent studies suggest significant differences among the antifungal susceptibility profiles of *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. parapsilosis*, particularly with respect to the echinocandin antifungal agents [11, 12], indicating that correct species identification may have a therapeutic impact.

Proteomic profiling by mass spectrometry is increasingly being used for species differentiation of a variety of microorganisms as an alternative to genome-based identification schemes. Several studies have reported the efficiency of matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) for fast and accurate identi-

I. Quiles-Melero · J. García-Rodríguez · J. Mingorance (✉)
Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ,
Paseo de La Castellana 261,
28046 Madrid, Spain
e-mail: jmingorancec.hulp@salud.madrid.org

A. Gómez-López
Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología,
Instituto de Salud Carlos III,
Ctra Majadahonda-Pozuelo Km 2, Majadahonda,
28220 Madrid, Spain

fication of bacteria, yeast and moulds [13–17]. The technique is rapid and simple, requires small amounts of cultivated micro-organisms and has minimal consumable expenses, so it is very attractive for clinical routine applications.

In this work, we have assessed the ability of MALDI-TOF mass spectrometry to identify *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* previously identified by pyrosequencing.

Materials and methods

Strains

Twenty-five strains that had been previously characterized by the Mycology Reference Laboratory, National Center for Microbiology in Spain [12] were employed as reference strains: 17 *C. parapsilosis*, 5 *C. orthopsilosis* and 3 *C. metapsilosis*. The strain *C. parapsilosis* ATCC 22019 was also included. A total of 77 isolates of *C. parapsilosis sensu lato* obtained from clinical samples in our hospital were included in this study. The clinical isolates were identified as *C. parapsilosis* by culture in CHROMagar Candida™ (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA), VITEK 1 (BioMérieux, Marcy l’Etoile, France) or auxanogram using API 20 C Aux (BioMérieux). Yeast genomic DNA was extracted using the Ultraclean Microbial DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA).

Pyrosequencing

Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a fragment of the *ITS1* region was performed using the primers Bio-ITSF (5'-biotin-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS-R (5'-TCCGTTGTTGAAAGTTTTGAC). The amplification program included a 5-min incubation at 95°C, followed by 45 cycles of: 95°C for 30 s, 45°C for 30 s, 72°C for 60 s and a final extension step of 3 min at 72°C. Two different regions within the amplification products were pyrosequenced using

primers ITS-R and ITSS (5'-GAGTTTAATCTCTGG-CAGGC) and the Pyrogold SQA kit in a PyroMark ID Pyrosequencing instrument (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The sequences obtained were compared with the reference sequences obtained from Genbank (accession numbers AJ635316, AJ698048, AJ698049) using Identifire© software (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

MALDI-TOF

The MALDI-TOF analysis was performed on yeast colonies grown in chromogenic agar at 35° for 48–72 h. The samples were processed following the manufacturer’s instructions for fungal identification. All the reagents were of the highest quality available. Briefly, the samples were suspended in 300 µl of chemically pure water and 900 µl of absolute ethanol (HPLC grade). After centrifugation at 13,000 rpm for 3 min, the supernatant was removed, and the dried pellet was resuspended in the same volume of formic acid (70%) plus another volume of acetonitrile. One microlitre of supernatant was spotted onto a steel target plate (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) and dried at room temperature, 1 µl of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution was added over the dry extract spot and left at room temperature until it was completely dry. Mass spectra were obtained using a Microflex LT Mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH) and Flex Control software. The system was set in the linear positive mode at a laser frequency of 20 Hz within a mass range from 2,000 to 20,000 Da. The instrument parameter settings were ion source 1 at 20 kV, ion source 2 at 18.5 kV, lens at 8.5 kV, pulsed ion extraction of 250 ns and no gating. For species identification, the spectra obtained from 240 laser shots in 30-shot steps from different positions of the target spot were compared with a reference library of spectra provided by the manufacturer (Reference Library 3.0.10) using the MALDI-Biotyper 2.0 software (Bruker Daltonik GmbH). The spectra were externally calibrated by using the manufacturer's standard (Bruker Daltonik

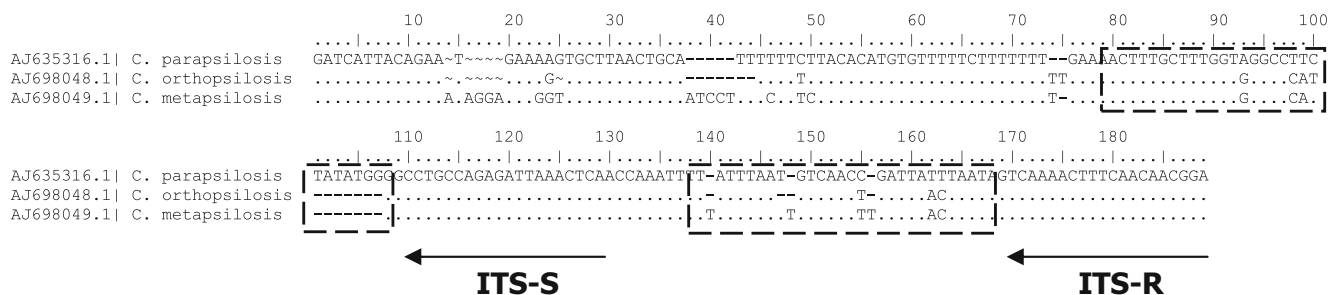


Fig. 1 Multiple alignment showing the sequences of the *ITS1* region in *Candida parapsilosis*, *metapsilosis* and *orthopsilosis*. The boxes indicate the regions sequenced with the primers ITS-R and ITS-S. The

forward biotinylated primer, bio-ITS-F, is immediately upstream of the sequences shown. Dots denote the identity to the uppermost sequence

Table 1 Source and species identified by the two methods: pyrosequencing and MALDI-TOF. Out of 77 clinical isolates, 2 *C. orthopsilosis* and 68 *C. parapsilosis* were obtained from blood culture samples. The remaining 9 *C. parapsilosis* were obtained from 1 pericardial fluid sample, 1 pleural fluid, 2 ascitic fluids, 1 synovial fluid, 1 catheter, 1 abscess and 1 bronchial aspirate

	MALDI-TOF	Pyrosequencing
Reference <i>C. parapsilosis</i>	18	18
Reference <i>C. orthopsilosis</i>	5	5
Reference <i>C. metapsilosis</i>	3	3
Clinical <i>C. parapsilosis</i>	75	75
Clinical <i>C. orthopsilosis</i>	2	2

GmbH). The results of the pattern-matching process were expressed as log(score) index.

Results

Identification of clinical isolates by pyrosequencing

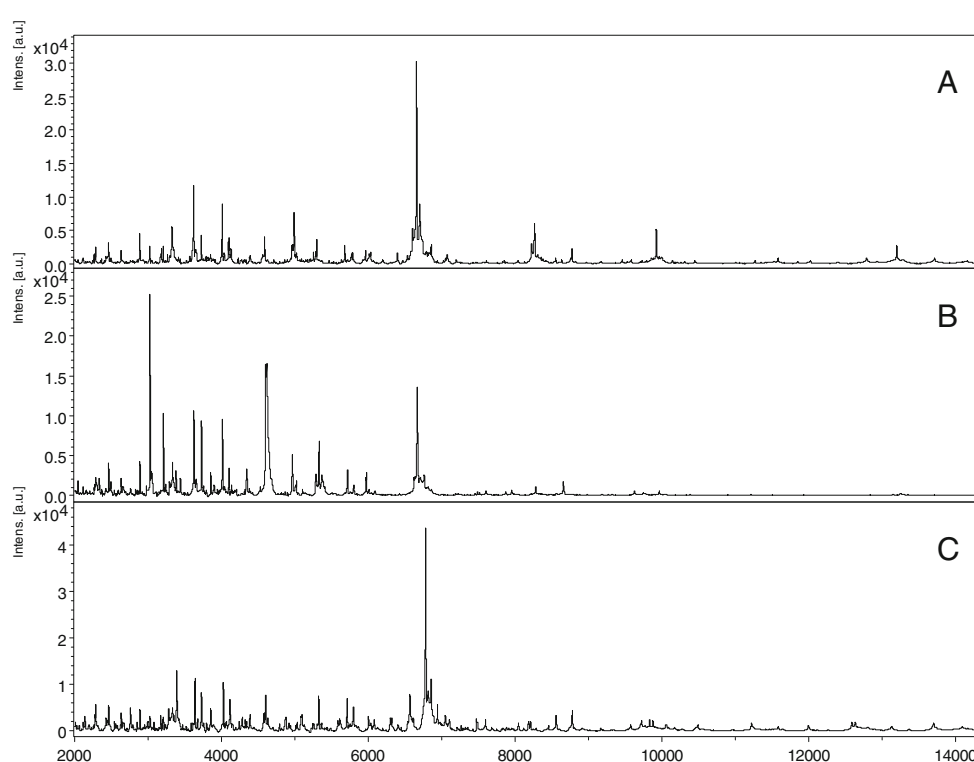
To set up a collection of *C. parapsilosis* complex strains we used 25 strains that had been previously characterized by the Mycology Reference Laboratory, National Center for Microbiology in Spain [12]. In addition, 77 clinical isolates

identified as *C. parapsilosis* by culture on chromogenic agar were used. Two short segments of the intergenic transcribed region between the 18S rRNA and the 5.8S rRNA genes, called the *ITS1* region, were used for identification of *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* by pyrosequencing based on the reference sequences defined by Tavanti et al. (Fig. 1) [9]. The identity of all the reference strains was confirmed by this method. Seventy-five clinical isolates were identified as *C. parapsilosis*, and two as *C. orthopsilosis* (Table 1).

Identification of clinical isolates by mass spectrometry

Mass spectrometry analysis of all the reference strains and clinical isolates was done in duplicate from colonies extracted by formic acid and acetonitrile treatment. The procedure yielded mass spectra that clearly differentiated from each other (Fig. 2) and from other *Candida* species. The 25 reference strains and the 77 clinical isolates could be correctly identified to the species level, and there were no cross-matches between the three species. The mean and standard deviation of the best-matching scores obtained were respectively 2.12 and 0.09 (range: 1.962–2.327), and all the duplicates yielded similar scores. There were no ambiguous identifications and agreement with the pyrosequencing data was 100%, indicating that the identification of species within the *C. parapsilosis* complex by MALDI-TOF is reliable.

Fig. 2 The MALDI-TOF mass spectra of three representative isolates. **a** *C. parapsilosis*, **b** *C. orthopsilosis*, **c** *C. metapsilosis*. These were compared with a proprietary mass spectra database (Reference Library 3.0.10) that included 11 strains of *C. parapsilosis*, 2 of *C. metapsilosis* and 3 of *C. orthopsilosis*. For each strain, the library contained a peak list with information on 70 peaks of different intensities within a mass range of 3,000 to 14,000 Da, the sample spectra were compared with the database spectra using MALDI-Biotyper 2.0 software (Bruker Daltonik GmbH)



Discussion

The differentiation of *C. parapsilosis sensu lato* into *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* is important from an epidemiological viewpoint, and several works now suggest that it is likely to have therapeutic relevance. Both *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* have been found to be more susceptible to all the antifungals currently in use [11, 12, 18, 19], and to have a lower ability to form biofilms in vitro [19, 20]. Furthermore, *C. metapsilosis* has been found to be less virulent than the other two species in an in vitro model of infection [21]. The main problem in doing surveys to study the role of these three species in infectious disease has been the lack of simple assays to correctly identify them. There are no phenotypic assays, and genotypic analyses (RAPD, sequencing) are usually laborious and need additional time after culture. Pyrosequencing technology results can be obtained within 4 h, which represents an improvement over Sanger automated sequencing methods, which would usually take 2 or more days. Pyrosequencing of *ITS2* has been used before, and has proved to reliably discriminate among *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*, even though there were only two polymorphic positions [10]. Sequencing of *ITS1* has also proved to be a valid method of identifying the three species [6, 9]. The two short regions of *ITS1* that we have used in this work include 11 polymorphic positions plus a short (8 nucleotides) insertion in *C. parapsilosis*, this design diminishes uncertainties while keeping the method simple and rapid. Either of these two pyrosequencing designs offers a relatively rapid alternative to standard genotypic assays.

Three recent studies have described the use of MALDI-TOF mass spectrometry to discriminate among *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* [14, 17, 22]. These works used reference strains to test the method, but did not validate the clinical isolates using an independent method. In the present work we have used a set of previously characterised reference strains, but in addition we have used *ITS1* sequencing as the reference method for the identification of clinical isolates described as *C. parapsilosis* by the phenotypic methods. We have found that MALDI-TOF mass spectrometry correctly discriminates among *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. Correlation with sequencing results was 100% showing that MALDI-TOF MS is a reliable, rapid and simple technique for the identification of these species within the *C. parapsilosis* group. MALDI-TOF results can be obtained in minutes with minimal manipulation from colonies grown in CHROMagar Candida™ or in Sabouraud (data not shown), making it an attractive tool for the routine of a clinical microbiology laboratory.

Acknowledgements J.M. was recipient of a Ramón y Cajal fellowship financed by the European Social Fund and the Ministerio de Ciencia e Innovación.

References

- Levin AS, Costa SF, Mussi NS, Basso SI, Sinto SI, Machado SC, Geiger DC, Villares MCB, Schreiber AZ, Barone AA, Branchini MLM (1998) *Candida parapsilosis* fungaemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30:243–249
- Lupetti A, Tavanti A, Davini O, Ghelardi E, Corsini I, Merusi A, Boldrini A, Campa M, Senesi S (2002) Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 40:2363–2369
- Kojic EM, Darouiche RO (2004) *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 17:255–267
- Weems JJ Jr (1992) *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* 14:756–766
- Lehmann PF, Lin DM, Lasker BA (1992) Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 30:3249–3254
- Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF (1995) Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol* 33:1815–1821
- Kato M, Ozeki M, Kikuchi A, Kanbe T (2001) Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida* species. *Gene* 272:275–281
- Nosek J, Tomaska L, Rycovska A, Fukuhara H (2002) Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 40:1283–1289
- Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC (2005) *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 43:284–292
- Borman AM, Linton CJ, Oliver D, Palmer MD, Szekely A, Odds FC, Johnson M (2009) Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal transcribed spacer 2 discriminates *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. *J Clin Microbiol* 47:2307–2310
- Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ (2008) Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 46:2659–2664
- Gómez-López A, Alatruey-Izquierdo A, Rodríguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, the Barcelona Candidemia Project Study Group (2008) Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of Candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1506–1509
- Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, Beretti J, Le Bourgeois LM, Semet-Gaudelus C, Segonds BP, Nassif X, Ferroni A (2008) Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 46:3361–3367
- Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG

- (2009) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 47:2912–2917
15. Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A, Brossas JY, Gene J, Symoens F (2009) Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin Microbiol Infect* 15:634–642
 16. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49:543–551
 17. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR (2010) Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 48:3482–3486
 18. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J, del Castillo L (2010) In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2194–2197
 19. De Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J (2011) Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect* 17:418–424
 20. Melo AS, Bizerra F, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL (2011) Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida spp.* isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol* 49:253–262
 21. Orsi CF, Colombari B, Blasi E (2010) *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the '*C. parapsilosis*' complex. *Med Mycol* 48:1024–1033
 22. Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Groß U, Kuhns M (2010) Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03398.x



**Servicio de
Microbiología
y Parasitología**