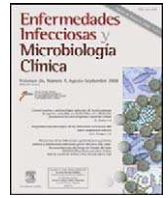


# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Espectrometría de masas *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight* vs. metodología convencional en la identificación de *Candida non-albicans*

Lucía Martínez-Lamas\*, María Luisa Pérez del Molino, Fernanda Pardo, Eduardo Varela y Benito José Regueiro

Servicio de Microbiología y Parasitología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 27 de noviembre de 2010

Aceptado el 29 de marzo de 2011

On-line el 22 de julio de 2011

#### Palabras clave:

*Candida non-albicans*

*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*

Espectrometría de masas

### R E S U M E N

**Introducción:** La infección por *Candida* se ha convertido en un importante problema de salud en todo el mundo. La epidemiología de la candidemia se ha modificado considerablemente por la emergencia de las especies de *Candida non-albicans*. Esta variación tiene especial importancia en la elección de la profilaxis y tratamiento empírico. Los métodos bioquímicos y los basados en biología molecular presentan limitaciones para la identificación correcta de las especies de *Candida*. El objetivo de este estudio es demostrar la capacidad del sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación de estas especies y compararlo con la tecnología utilizada en la actualidad.

**Métodos:** Se incluyeron todos los aislados recogidos durante dos años (n=73) de *Candida non-albicans* procedentes de muestras invasivas. La identificación se realizó mediante los sistemas Vitek-2 YST y API CAUX. Las identificaciones del MALDI-TOF se hicieron con el sistema Axima Confidence (Shimadzu Corporation), utilizando el software Shimadzu Launchpad y la base de datos SARAMIS (AnagnosTec GmbH). Las discrepancias se resolvieron mediante PCR multiplex LightCycler SeptiFast, PCR específica de *C. glabrata* y digestión enzimática con BanI del fragmento SADH en los aislados de *C. parapsilosis*.

**Resultados:** De los 73 aislados de *Candida non-albicans*, los métodos bioquímicos identificaron de forma concluyente 67 a nivel de especie y 6 a nivel de género. El sistema MALDI-TOF obtuvo identificaciones a nivel de especie en todas ellas. La correlación en la especie de todos los aislados estudiados fue del 85,07%, llegando al 94,52% si se estudia la correlación entre la identificación obtenida mediante métodos bioquímicos junto con los métodos empleados para el análisis de las discrepancias. En los aislados de *C. parapsilosis*, el sistema MALDI-TOF obtuvo una identificación de *C. orthopsilosis* en tres de ellos, confirmándose por digestión con BanI del fragmento SADH.

**Conclusión:** En este estudio se ha demostrado la utilidad de la espectrometría de masas (sistema MALDI-TOF) para dotar al laboratorio de microbiología de una mayor eficiencia y fiabilidad para la identificación a nivel de especie de los aislados de *Candida non-albicans*. Además de mostrar su posible utilidad para la identificación de especies relacionadas como *C. parapsilosis*, *orthopsilosis* y *metapsilosis*.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry vs conventional methods in the identification of *Candida non-albicans*

### A B S T R A C T

#### Keywords:

*Candida non-albicans*

*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*

Mass spectrometry

**Introduction:** *Candida* infection has become a major health problem worldwide. The epidemiology of *Candida* infection has substantially changed by the emergence of the species *Candida non-albicans*. This variation is particularly important in the choice of prophylaxis and empirical treatment. The methods based on biochemical and molecular biology have limitations for the correct identification of *Candida* species. The aim of this study is to demonstrate the ability of the MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of these species and compare it with the technology used today.

**Methods:** We included all isolates collected over 2 years (n=73) of *Candida non-albicans* from non-invasive samples. The identification was carried out by Vitek-2 systems YST and API CAUX. The MALDI-TOF identifications were made with Confidence Axima system (Shimadzu Corporation) using the Shimadzu

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lu.13128@hotmail.com (L. Martínez-Lamas).

Launchpad software and database SARAMIS (AnagnosTec GmbH). Discrepancies were resolved by Septi-Fast LightCycler multiplex PCR, specific PCR *C. glabrata* and enzymatic digestion with BnlI SADH fragment in isolates of *C. parapsilosis*.

**Results:** Of the 73 isolates of *Candida non-albicans*, the biochemical methods conclusively identified 67 to species level and 6 at the genus level. The MALDI-TOF system obtained identifications at the species level in all cases. The correlation in the species of all isolates studied was 85.07%, reaching 94.52% when the correlation was made between the identification obtained by biochemical methods and the methods for the analysis of the discrepancies. In isolates of *C. parapsilosis*, MALDI-TOF system obtained an identification of *C. orthopsilosis*. In 3 of them it was confirmed by digestion with BnlI SADH fragment.

**Conclusion:** This study has demonstrated the use of mass spectrometry (MALDI-TOF system) to provide the microbiology laboratory with greater efficiency and reliability to identify isolates of *Candida non-albicans* to species level. It also shows its potential usefulness in identifying related species, such as *C. parapsilosis*, *metapsilosis* and *orthopsilosis*.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

La infección por *Candida* se ha convertido en los últimos años en un importante problema de salud en todo el mundo<sup>1,2</sup>, debido a los cambios experimentados en la población de riesgo<sup>3</sup>. Esta infección se asocia con un aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad. Los estudios retrospectivos de cohortes con pacientes con candidemia y diferentes enfermedades de base cifran la mortalidad cruda entre un 30–81% y atribuible 50–71%. En estudios recientes la tasa de mortalidad cruda a las 12 semanas se sitúa en un 35,2%<sup>4</sup>, correspondiendo las tasas más elevadas a infecciones por *Candida non-albicans*<sup>5,6</sup>.

Existen diferencias en la epidemiología de la candidemia entre los diferentes países. En España, la incidencia se sitúa entre 0,76 y 0,81 por 100 ingresos, rango mayor al observado en otros países europeos, EE. UU. y Canadá. *Candida* spp. es en frecuencia el sexto patógeno aislado en sangre, y la infección por este organismo supone un 10% de todas las infecciones con un número estimado de 4,3 episodios de candidemia por cada 1.000 habitantes<sup>2</sup>.

Aunque *Candida albicans* continúa siendo la especie más frecuente, se observa la emergencia de especies de *Candida non-albicans*, la aparición de especies resistentes a azoles y el desarrollo de resistencias secundarias en aislados previamente sensibles<sup>7</sup>. Este aumento se ha asociado con el uso de catéteres vasculares y de nutrición parenteral, neoplasia, neutropenia y exposición previa a azoles. *C. parapsilosis* causa la mayoría de procesos infecciosos debidos a especies *non-albicans*. En general la elección de profilaxis y recomendaciones terapéuticas se basan en la posible implicación de *C. glabrata* o *C. krusei*, resistentes a azoles<sup>5,8</sup>.

La identificación de levaduras se realiza habitualmente por métodos comerciales basados en la asimilación de carbohidratos como API ID 32C, API CAUX o mediante métodos automatizados como el sistema Vitek ID YST (BioMérieux, Marci LiÉtoile, Francia), así como mediante estudios morfológicos en agar harina de maíz o agar arroz, junto con la utilización de medios cromogénicos diferenciales. Entre los problemas de los métodos de identificación fenotípicos destacan su lentitud, condicionada por el crecimiento del hongo, la existencia de bases de datos limitadas y el gran número de identificaciones incorrectas proporcionadas por estos sistemas<sup>1</sup>. Recientemente se han desarrollado alternativas basadas en técnicas de ADN como la PCR que han aumentado la rapidez diagnóstica y mejorado la capacidad de diferenciación entre especies. Debido a su elevado coste, mayor tiempo de realización y necesidad de personal experto para su interpretación, están en fase de adaptación a la práctica clínica<sup>6</sup>.

La importancia de la diferenciación de aislados desde el punto de vista epidemiológico y de la identificación rápida de las levaduras a nivel de especie, demanda un sistema que suponga un avance tecnológico en este campo<sup>9</sup>. En este contexto, el sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF es una herramienta

emergente capaz de proporcionar una identificación rápida de especies microbianas a partir de colonias aisladas, siendo incluso capaz de diferenciar a nivel de subespecie, como ha quedado demostrado en numerosos trabajos<sup>10–12</sup>.

El objetivo de este estudio es demostrar la aplicación del sistema MALDI-TOF en la identificación de especies de *Candida non-albicans* procedentes de aislados clínicos y comparar los resultados con los obtenidos por los métodos bioquímicos disponibles en la actualidad.

## Material y métodos

### Aislados clínicos

En el estudio se incluyeron los 73 aislados de *Candida non-albicans* obtenidos a partir de muestras invasivas recibidas en un período de dos años, entre mayo de 2008 y mayo 2010, en el Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). Las muestras se sembraron en medios de cultivo habituales de acuerdo con la metodología microbiológica convencional y se subcultivaron en agar Sabuoraud con 2% glucosa (Becton dickinson, Heidelberg, Alemania) y en CHROMagar *Candida* (Becton dickinson, Heidelberg, Alemania) para su identificación presuntiva.

### Identificación bioquímica

La identificación bioquímica se realizó mediante el sistema automatizado Vitek-2 YST (BioMérieux, Marci LiÉtoile, Francia) y cuando el sistema no ofreció una identificación fiable con porcentajes superiores al 95%, se reidentificó mediante API CAUX (BioMérieux, Marci LiÉtoile, Francia).

### MALDI-TOF MS

Tras la incubación de los aislados 48 horas en agar Sabuoraud con 2% glucosa, se transfirieron 2–3 colonias a un tubo de extracción con tapón de rosca de 1,5 ml (Eppendorf, Alemania) mezclándose con 0,5 ml de etanol absoluto y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sedimento resultante se secó al aire y se mezcló con 50 ul de ácido fórmico al 25%. Se depositaron 0,5 ul del sobrenadante sobre la placa de MALDI-TOF MS y se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, se añadió 0,5 ul de la matriz ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) para la precipitación de las proteínas y péptidos celulares.

Los espectros de picos se generaron con el sistema Axima Confidence (Shimadzu Corporation), utilizando el software Shimadzu Launchpad y la base de datos SARAMIS (AnagnosTec GmbH) para la medida e identificación automáticas. Los porcentajes de confianza en la identificación a nivel de familia, género y especie se generaron

**Tabla 1**

Comparación de la identificación de 73 *Candida no-albicans* mediante métodos microbiológicos convencionales y mediante espectrometría de masas *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*

Identificación convencional (n.º cepas)	Identificación MALDI-TOF (n.º cepas)	Correlación en la especie, %
<i>C. parapsilosis</i> (38)	<i>C. parapsilosis</i> (35) <i>C. orthopsilosis</i> (3)	92,1
<i>C. glabrata</i> (12)	<i>C. glabrata</i> (12)	100
<i>C. krusei</i> (7)	<i>C. krusei</i> (5) <i>C. albicans</i> (1) <i>C. glabrata</i> (1)	71,4
<i>C. famata</i> (3)	<i>C. albicans</i> (2) <i>C. Krusei</i> (1)	0
<i>C. tropicalis</i> (3)	<i>C. tropicalis</i> (3)	100
<i>C. lusitaniae</i> (1)	<i>C. lusitaniae</i> (1)	100
<i>C. sphaerica</i> (1)	<i>C. glabrata</i> (1)	0
<i>C. dubliniensis</i> (1)	<i>C. glabrata</i> (1)	
<i>C. keffir</i> (1)	<i>C. keffir</i> (1)	100
<i>Candida</i> spp. (6)	<i>Pichia guilliermondii</i> (2) <i>C. glabrata</i> (2) <i>C. krusei</i> (1) <i>C. albicans</i> (1)	NP

NP: no procede.

por comparación con los superespectros de la base de datos del sistema. Sólo los porcentajes mayores del 90% se consideraron válidos en este estudio. El espectrómetro se calibró externamente utilizando la cepa de *Escherichia coli* de referencia para el sistema.

#### Análisis de las discrepancias

##### Reidentificación de los aislados de *Candida parapsilosis*

La redefinición del grupo taxonómico de *C. parapsilosis* incluye dos especies adicionales: *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, incluidas en las bases de datos del sistema MALDI-TOF MS. Para la reidentificación de los aislados de *C. parapsilosis* se utilizó el método de digestión con BanI del fragmento SADH (*secondary alcohol dehydrogenase*) descrito por Tavanti et al<sup>13</sup>.

##### Reidentificación de los aislados de *Candida glabrata*

Recientemente se ha constatado que fenotípicamente *Candida glabrata* puede comportarse como *Candida nivariensis* y *Candida bracariensis*. Con el fin de asegurar la identificación correcta de esta especie de *Candida* y para el análisis de resultados discrepantes, se empleó una PCR específica de *C. glabrata* con los primeros CGL1 y CGL2 descritos previamente<sup>14,15</sup>.

##### Identificación genotípica mediante PCR real-time multiplex

Para la confirmación de los resultados discrepantes por ambos métodos se utilizó el sistema LightCycler SeptiFast test M<sup>grade</sup> (Roche Diagnostics GmbH), previa lisis mecánica por sistema MagnaLyser (Roche Diagnostics GmbH) y extracción con el sistema automático MagnaPure Compact (Roche Applied Science, GmbH), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permite la identificación de 5 especies de *Candida* sp. (*C. albicans*,

**Tabla 2**

Discrepancias obtenidas entre los métodos convencionales y el sistema MALDI-TOF

Identificación bioquímica (n.º cepas)	Identificación MALDI-TOF (n.º cepas)	PCR <i>C. glabrata</i> específica	PCR LightCycler SeptiFast (n.º cepas)	SADH
<i>C. famata</i> (2)	<i>C. albicans</i> (2)	NP	<i>C. albicans</i> (2)	NP
<i>C. krusei</i> (1)	<i>C. albicans</i> (1)	NP	<i>C. albicans</i> (1)	NP
<i>C. sphaerica</i> (1)	<i>C. glabrata</i> (1)	+	NP	NP
<i>C. krusei</i> (1)	<i>C. glabrata</i> (1)	+	NP	NP
<i>C. famata</i> (1)	<i>C. krusei</i> (1)	NP	<i>C. albicans</i> (1)	NP
<i>C. dubliniensis</i> (1)	<i>C. glabrata</i> (1)	+	NP	NP
<i>C. parapsilosis</i> (3)	<i>C. orthopsilosis</i> (3)	NP	NP	+

NP: no procede.

**Tabla 3**

Identificación de los aislados *Candida* spp. a nivel de especie por el sistema MALDI-TOF MS

Identificación MALDI-TOF (n.º cepas)	PCR <i>C. glabrata</i> específica	PCR LightCycler SeptiFast
<i>Pichia guilliermondii</i> (2)	NP	—
<i>C. glabrata</i> (2)	+	NP
<i>C. albicans</i> (1)	NP	<i>C. albicans</i>
<i>C. krusei</i> (1)	NP	<i>C. parapsilosis</i>

NP: no procede.

*C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*), mediante la amplificación de las regiones ITS (*internal transcribed spacer*) del ADN.

## Resultados

Los métodos bioquímicos identificaron de forma concluyente 67 de los 73 aislados de *Candida no-albicans* a nivel de especie y 6 a nivel de género. El sistema MALDI-TOF MS obtuvo identificaciones a nivel de especie en todas ellas con un porcentaje superior al 90%.

Se obtuvieron resultados concordantes en 35 *C. parapsilosis*; 12 *C. glabrata*; 5 *C. krusei*; 3 *C. tropicalis*; 1 *C. lusitaniae*, y 1 *C. kefir*. La correlación en la especie de todos los aislados estudiados fue del 85,07%, llegando a un valor del 94,52% si se estudia la correlación entre la identificación obtenida mediante todas las técnicas de confirmación utilizadas respecto al sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF (tabla 1).

En diez aislados se encontraron discrepancias por ambos métodos. La ausencia de correlación se cifra en el 5,48% correspondientes a dos aislados no confirmados de *Pichia guilliermondii* y otros dos en los que se obtuvo una identificación diferente por los cuatro métodos de confirmación (tabla 2).

En los 38 aislados de *C. parapsilosis* identificados por los métodos convencionales, el sistema MALDI-TOF obtuvo una identificación de *C. orthopsilosis* en tres de ellos que se confirmaron como tales por el método de digestión con BanI del fragmento SADH.

Los resultados de los aislados que bioquímicamente se clasificaron como *Candida* spp. se muestran en la tabla 3.

## Discusión

La identificación correcta y rápida de los hongos patógenos, aislados a partir de muestras clínicas es uno de los objetivos a alcanzar para el manejo correcto del paciente con candidemia y para el control de la infección fúngica invasora. Conociendo la variabilidad en la susceptibilidad a antifúngicos inherente a las diferentes especies de *Candida*, la correcta identificación a nivel de especie es a menudo crítica para tomar decisiones terapéuticas.

Como se ha demostrado, la combinación de varios sistemas de identificación contribuye a la calidad y eficacia de la identificación llevada a cabo de forma convencional en el laboratorio de la especie de *Candida*<sup>16</sup>. Los sistemas basados en la biología molecular presentan limitaciones relacionadas con su complejidad,

fundamentalmente debido a la preparación de la muestra, la posibilidad de contaminación ambiental, aplicación limitada sobre muestra clínica directamente, etc. En la práctica, a pesar de su teórica rapidez y de surgir como alternativa a los métodos convencionales fenotípicos, se reservan como métodos confirmatorios<sup>11</sup>.

En este estudio se ha demostrado la utilidad del sistema MALDI-TOF que es capaz de proporcionar un espectro de picos para la identificación de *Candida* sp. a nivel de género y especie<sup>9</sup>. La correlación entre este nuevo método y los métodos disponibles en el laboratorio ha alcanzado un valor mayor al 85%. El hecho de que este valor supere el 90% al combinar los diferentes métodos de confirmación de identificación pone de manifiesto tanto la superioridad del sistema MALDI-TOF, como el elevado número de errores atribuidos a los métodos convencionales empleados en el laboratorio; estos valores de correlación elevados son similares a los obtenidos en estudios previos<sup>12</sup>. No obstante, los estudios de aplicación de la espectrometría de masas para la identificación de especies fúngicas son más recientes que los llevados a cabo en bacterias, ya que es evidente que para obtener los espectros característicos en el caso de estos microorganismos se necesitan varios pasos previos de preparación de la muestra, que implican la lisis celular y que hacen el proceso más complejo que en el caso de las bacterias. Estudios recientes han demostrado que la fijación con alcohol permite obtener resultados reproducibles, además de favorecer la suspensión celular previa a la disposición de la muestra en la placa de MALDI-TOF. Este sistema comparado con otros métodos de lisis ha demostrado ser el mejor de ellos, resultando un método rápido y sencillo de preparación de muestras fúngicas<sup>9</sup>.

En nuestro estudio se pone de manifiesto que el uso de los sistemas bioquímicos, puede confundir los aislados de *C. famata* con *C. albicans*, no obstante, el número reducido de aislados incluidos en el trabajo refleja la necesidad de estudios posteriores que confirmen este hecho. Además, en concordancia con lo demostrado en otros trabajos<sup>17</sup>, el MALDI-TOF parece ser un sistema útil para la identificación de especies relacionadas como *C. parapsilosis*, *orthopsilosis* y *metapsilosis*. De los 38 aislados de *C. parapsilosis* clasificadas por los métodos convencionales, detectó el total de aislados de *C. orthopsilosis* confirmados posteriormente como tales por digestión enzimática. El interés en la caracterización correcta del grupo «*psilosis*» no es sólo epidemiológico, sino que es importante debido a las posibles diferencias en los estudios de sensibilidad a antifúngicos. Estas nuevas especies estrechamente relacionadas con *C. parapsilosis* han mostrado sensibilidades disminuidas a anfotericina B e incluso a las equinocandinas<sup>18,19</sup>. Del mismo modo se ha atribuido una virulencia menor a *C. metapsilosis* que a *C. parapsilosis* y *orthopsilosis*<sup>13,16</sup>. No obstante, la prevalencia de estas especies en España es todavía baja con valores que se sitúan entre 1,4-1,7%, como productoras de candidemia<sup>18</sup>.

Puesto que, este sistema ha demostrado la capacidad de diferenciar entre aislados del grupo «*psilosis*», podría pensarse en la aplicación de este método para la discriminación de *C. glabrata*, *C. nivariensis* y *C. braccariensis*, fenotípicamente indistinguibles. En los últimos años se ha observado un aumento en su incidencia, mostrando CMI elevadas a azoles y equinocandinas; por ello parece prudente buscar nuevos sistemas que permitan asignar de forma correcta su identificación con el fin de monitorizar estos patógenos con multiresistencia emergentes<sup>20,21</sup>.

De forma global, la identificación mediante espectrometría de masas presenta varias ventajas fundamentales: sencillez en la preparación de muestra, no necesidad de tinción de gram, escaso volumen, rapidez en la obtención de resultados (once minutos) y el bajo coste a pesar de tratarse de un equipo caro con un precio es comparable al de otros equipos comunes en el laboratorio de microbiología y un coste de material fungible prácticamente nulo<sup>10-12</sup>. Una limitación de este sistema es que no proporciona datos de susceptibilidad a antimicrobianos, sin embargo, la

resistencia a antibióticos depende de la producción de péptidos y proteínas específicas, por lo que la aplicación de los espectrómetros de masas en este campo es una futura posibilidad. Estudios recientes han demostrado la posibilidad y las ventajas de la aplicación del sistema MALDI-TOF sobre muestra clínica y hemocultivo positivo<sup>22-24</sup>. Existen publicaciones en los que se identificaron de forma correcta el 100% de los aislados de *C. albicans*. No obstante, en otros trabajos se pone de manifiesto la limitación de este nuevo método en la detección de fungemia por *Candida* sp.<sup>21,25</sup>. Probablemente en relación con la baja concentración de microorganismos en sangre que en esta entidad clínica puede ser menor de 100 ufc/ml<sup>16</sup>.

Trabajos recientes han estudiado la aplicación de la espectrometría de masas en el tipado de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, obteniéndose una elevada heterogeneidad entre los aislados estudiados, lo que refleja la elevada complejidad biológica de las levaduras y convierte al sistema MALDI-TOF en un complemento de las herramientas de tipado disponibles, importante para conocer los patrones de dispersión de la infección fúngica desde el punto de vista epidemiológico, lo que amplía todavía más las aplicaciones de este nuevo método<sup>22</sup>.

En el futuro podría plantearse como método previo a la secuenciación del 16S reduciéndose así el coste y tiempo necesarios para la identificación microbiológica. No obstante, en la actualidad esta aplicación pasa por la necesidad de mejora, ampliación y consenso de las bases de datos de los principales patógenos humanos disponibles por el sistema<sup>11,12,26</sup>.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Sociedad española de microbiología, enfermedades infecciosas. Documento consenso. Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:32-9.
2. Cisterna R, Ezpeleta G, Telleria O, Guinea J, Regueiro B, García-Rodríguez J, et al. Nationwide Sentinel Surveillance of Bloodstream *Candida* Infections in 40 Tertiary Care Hospitals in Spain. *J Clin Microbiol*. 2010;48:4200-6.
3. Buoza E, Muñoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32 Suppl 2:S87-91.
4. Nace HL, Horn D, Neofytos D. Epidemiology and outcome of multiple-species candidemia at a tertiary care center between 2004 and 2007. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64:289-94.
5. Picazo JJ, González-Romo F, Candel FJ. Candidemia in the critically ill patient. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32 Suppl 2:S83-5.
6. Uno K, Sugiura S, Konishi M, Yasuda Y, Mikasa K, Kita E. Evaluation of diagnostic methods for *Candida albicans* translocation in a mouse model: seminested polymerase chain reaction, blood culture, and serological assays. *J Infect Chemother*. 2007;13:196-203.
7. Labbé A-C, Pépin J, Patiño C, Castonguay S, Restieri C, Laverdiere M. A single-centre 10-year experience with *Candida* bloodstream infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2009;20:45-50.
8. Mensa J, Pitart C, Marco F. Treatment of critically ill patients with candidemia. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32 Suppl 2:S93-7.
9. Qian J, Cutler JE, Cole RB, Cai Y. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Anal Bioanal Chem*. 2008;392:439-49.
10. Ferreira L, Vega S, Sánchez-Juanes F, González M, Herrero A, Muñoz MC, et al. Identificación bacteriana mediante espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight. Comparación con la metodología habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:492-7.
11. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1169-75.
12. 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;47:2912-7.

13. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* sp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005;43:284–92.
14. Alcoba-Florez J, del Pilar Arévalo M, González-Paredes FJ, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, et al. PCR protocol for specific identification of *Candida nivariensis*, a recently described pathogenic yeast. *J Clin Microbiol.* 2005;43:6194–6.
15. Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2860–5.
16. Paulo C, Mourão C, Veiga PM, Marques JM, Rocha G, Alves AF, et al. Retrospective analysis of clinical yeast isolates in a hospital in the centre of Portugal: spectrum and revision of the identification procedures. *Med Mycol.* 2009;47:836–44.
17. Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Groß U, Kuhn M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2010. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03398.x. [Epub ahead of print].
18. 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;52:1506–9.
19. Kocsubé S, Tóth M, Vágvölgyi C, Dóczy I, Pesti M, Pócsi I, et al. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. *J Med Microbiol.* 2007;56:190–5.
20. Borman AM, Petch R, Linton CJ, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM. *Candida nivariensis*, an Emerging Pathogenic Fungus with Multidrug Resistance to Antifungal Agents. *J Clin Microbiol.* 2008;46:933–8.
21. 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;47:1216–7.
22. Ferroni A, Suárez S, Beretti J-L, Dauphin B, Bille E, Meyer J, et al. Real-Time Identification of Bacteria and *Candida* Species in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1542–8.
23. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-offlight mass spectrometry. *PLoS One.* 2009;4:e8041.
24. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:444–7.
25. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Guerra IP, García García MI, Sánchez JE, González-Buitrago JM, et al. Microorganisms direct identification from blood culture by maldi-tof mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2010;17:546–51.
26. Putignani L, Del Chierico F, Onori M, Mancinelli L, Argentieri M, Bernaschi P, et al. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Mol Biosyst.* 2011;7:620–9.